

**EINFLUSS VON *EIMERIA BOVIS*  
AUF DIE APTOTOFÄHIGKEIT  
DER WIRTSZELLE *IN VITRO***

**MIRJAM LANG**



**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Parasitologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. H. Zahner

**Einfluss von *Eimeria bovis* auf die Apoptosefähigkeit  
der Wirtszelle *in vitro***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Mirjam Lang**  
Tierärztin aus Würzburg

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. H. Zahner  
Prof. Dr. Dr. S. Arnhold

Tag der Disputation: 24. April 2008

**„Und es war trotzdem nicht umsonst  
Im Zweifel war es für die Kunst  
Allein darauf lässt Du´s nicht beruhen  
Denn wenn Du ehrlich zu Dir bist  
Weißt Du, wenn's noch mal so weit ist  
Du würdest alles ganz genauso tun... denn  
Irgendetwas bleibt, irgendetwas bleibt - ganz sicher zurück“**

„Irgendetwas bleibt“ Album: BINGO Text: Bela B. Felsenheimer  
mit freundlicher Genehmigung des PMS Musikverlag

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Eimeria bovis</i> .....</b>	<b>2</b>
2.1.1	Vorkommen und Bedeutung von <i>Eimeria bovis</i> .....	2
2.1.2	Entwicklungszyklus von <i>Eimeria bovis</i> .....	2
2.1.3	Geeignete Wirtszelllinien zur Etablierung eines <i>in vitro</i> -Systems für <i>E. bovis</i> .....	3
2.1.4	Bisherige <i>in vitro</i> -Untersuchungen zur Interaktion von <i>Eimeria bovis</i> - Sporozoiten mit ihren Wirtszellen.....	3
<b>2.2</b>	<b>Apoptose .....</b>	<b>6</b>
2.2.1	Apoptose und Nekrose .....	6
2.2.2	Die Signalkaskaden der Apoptose.....	9
2.2.3	Caspasen und ihre Funktion .....	13
2.2.4	Regulatoren der Apoptose .....	14
2.2.4.1	IAP-Familie .....	14
2.2.4.2	c-FLIP.....	15
2.2.4.3	Bcl-2-Familie.....	16
2.2.4.4	Hitzeschock Proteine (HSP) .....	19
2.2.4.5	Poly-ADP-ribose-polymerase (PARP) .....	22
2.2.4.6	p53 .....	23
2.2.4.7	NFκB und IκB .....	23
<b>2.3</b>	<b>Modulation der Apoptose durch intrazelluläre Parasiten.....</b>	<b>23</b>
2.3.1	<i>Eimeria tenella</i> und <i>Eimeria necatrix</i> .....	24
2.3.2	<i>Toxoplasma gondii</i> .....	24
2.3.3	<i>Cryptosporidium parvum</i> .....	25
2.3.4	<i>Plasmodium spp.</i> .....	27
2.3.5	<i>Theileria parvum</i> .....	28
2.3.6	<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	29
2.3.7	<i>Leishmania spp.</i> .....	30
2.3.8	<i>Nosema algerae</i> .....	31
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Parasit <i>Eimeria bovis</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Versuchstiere.....</b>	<b>33</b>
3.2.1	Kälber .....	33

3.2.2	Infektion von Kälbern mit <i>Eimeria bovis</i> - Oozysten.....	33
3.2.3	Gewinnung und Sporulation der <i>Eimeria bovis</i> - Oozysten.....	34
3.2.4	Gewinnung von <i>Eimeria bovis</i> - Sporozoiten .....	35
<b>3.3</b>	<b>Wirtszelllinien .....</b>	<b>36</b>
3.3.1	Bovine fetale Gastrointestinalzellen (BFGC).....	36
3.3.2	African Green Monkey Kidney Cells (Vero) .....	38
3.3.3	Bovine Umbilical Vein Cells (BUVEC) .....	38
3.3.4	Infektion der Wirtszellen .....	39
<b>3.4</b>	<b>Apoptoseinduktoren .....</b>	<b>39</b>
3.4.1	Actinomycin D .....	39
3.4.2	Cytochalasin B.....	40
3.4.3	Colchicin.....	40
3.4.4	Bestimmung der notwendigen Konzentrationen der Apoptoseinduktoren für BFGC.....	40
3.4.5	Bestimmung der notwendigen Konzentrationen der Apoptoseinduktoren für Vero-Zellen.....	41
<b>3.5</b>	<b>Lichtmikroskopische Darstellung der Apoptose .....</b>	<b>42</b>
<b>3.6</b>	<b>Apoptosenachweis mittels TUNEL-Assay .....</b>	<b>43</b>
<b>3.7</b>	<b>Annexin V-Test .....</b>	<b>44</b>
3.7.1	Bestimmung AnnexinV positiver Zellen.....	44
3.7.2	Vitalfärbung mit Trypanblau .....	46
<b>3.8</b>	<b>Caspase 3-Nachweis mittels Fluoroscans .....</b>	<b>47</b>
<b>3.9</b>	<b>Cytochrom-c-Nachweis mittels ELISA.....</b>	<b>48</b>
<b>3.10</b>	<b>Konfokalmikroskopie.....</b>	<b>50</b>
3.10.1	Vorbereitung der Präparate.....	50
3.10.2	Färbung der Präparate.....	51
3.10.3	Mikroskopie.....	52
3.10.4	Quantifizierung der Fluoreszenzintensität.....	52
<b>3.11</b>	<b>Western Blot und Immunfärbung .....</b>	<b>53</b>
3.11.1	Vorbereitung des Zellmaterials .....	53
3.11.2	SDS-PAGE und Proteintransfer (Western Blot) .....	54
3.11.3	Blockieren der Membran und Inkubation mit Antikörpern und Visualisierung der Reaktion.....	57



<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
4.1	<i>In vitro</i> Entwicklung von <i>E. bovis</i> und Einfluss des Parasiten auf die Überlebensfähigkeit der Wirtszelle.....	59
4.2	Induktion der Apoptose bei nicht infizierten BFGC und Vero-Zellen.....	63
4.3	Einfluss von <i>E. bovis</i> auf die Apoptosefähigkeit von BFGZ und Vero-Zellen ..	68
4.4	Nachweis der Apoptoseinhibition durch <i>E. bovis</i> -Sporozoiten mittels TUNEL-Assay .....	71
4.5	Versuch der Quantifizierung der Apoptose anhand der Annexin V-Expression. ....	74
4.6	Versuch der Quantifizierung der Apoptose anhand der Caspase 3-Aktivierung mittels Fluoroscans .....	80
4.7	Versuch der Quantifizierung der Apoptose durch den Nachweis von Cytochrom-c als Indikator für den mitochondrialen Weg der Apoptose (Untersuchungen mittels ELISA).....	83
4.8	Einfluss von <i>E. bovis</i> auf Apoptosewege .....	84
4.8.1	Nachweis von c-IAP1 .....	85
4.8.1.1	Nachweis von c-IAP1 mittels konfokalmikroskopischer Untersuchungen ..	85
4.8.1.2	Nachweis von c-IAP1 im Immunoblot.....	91
4.8.2	Nachweis von c-FLIP .....	92
4.8.2.1	Nachweis von c-FLIP mittels konfokalmikroskopischer Untersuchungen ..	92
4.8.2.2	Nachweis von c-FLP im Immunoblot .....	96
4.8.3	Nachweis von Bcl-2 .....	97
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>112</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>124</b>

## Abkürzungen

### A

ADP	Adenosindiphosphat
AIF	apoptosis inducing factor
Annexin V	Protein, das an Phosphatidylserine bindet
Apaf-1	apoptosis protease activating factor-1
APO-1	= CD95 = Fas = Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie
Apoptosom	Komplex aus Cytochrom c, Procaspase 9 und Apaf-1
ATP	Adenosintriphosphat

### B

Bad	Bcl-xL/Bcl2 associated death promoter, Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
Bak	Bcl2 antagonist/killer, Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
Bax	Bcl2 associated x protein, Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
Bcl-2	B-cell-lymphoma-2
Bcl-w	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptoseinhibitor
Bcl-xL	„long form“ der Bcl-x Isoform, Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptoseinhibitor
Bcl-xS	„short form“ der Bcl-x Isoform, Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptoseinhibitor
BFGC	Bovine fetale gastrointestinal Zellen
Bfl-1/A1	aus der fetalen Leber isoliertes Bcl-2 Homolog, Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptoseinhibitor
BH3	Bcl2 homolog domain 3, Mitglied der Bcl-2-Familie
BHRF1	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptoseinhibitor
Bid	BH3 interacting domain, Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
Bik	BH3 interacting killer, Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
Bim	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
Bir-Domäne	Baculovirus IAP repeat Domäne
Bmf	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
Bok	Bcl2 related ovarian killer, Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
Boo	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptoseinhibitor
Bruce	Mitglied der IAP-Familie
BSLEC	bovine spleen lymphatic endothelial cells
BUVEC	Bovine umbilical vein cells
BW720c	theilerizides Naphtoquinonderivat

### C

CAD	caspase-activated deoxyribonuclease
CARD	caspase recruitment domain
CASH	caspase homologue = c-FLIP = I-FLICE = Casper = CLARP = FLAME = MRIT = Usurpin
Caspase	Cysteiny aspartic acid protease
Caspase 3	= Apopain = Effektorcaspase
Caspase 9	= Apaf-3 = apoptosis protease activating factor-3

Casper	caspase eight related protein = c-FLIP = I-FLICE = Cash = CLARP = FLAME = MRIT = Usurpin
CC-Chemokine	Chemokine, bei denen die ersten beiden Cysteinreste in der Aminosäuresequenz direkt aufeinander folgen
CD4 <sup>+</sup>	Koprotein auf T-Helferzellen, das an MHC II Moleküle bindet
CD95	= Fas = APO-1 = Mitglied der TNF-Rezeptor Familie
Cdc37	Koprotein von HSP90
c-FLIP	cellular Flice inhibitory protein = I-FLICE = Casper = Cash = CLARP = FLAME = MRIT = Usurpin
c-IAP1	cellular inhibitor of apoptosis protein 1
c-IAP2	cellular inhibitor of apoptosis protein 2
CLARP	caspase like apoptosis regulator protein = c-FLIP = I-FLICE = Casper = Cash = FLAME = MRIT = Usurpin
c-met	Rezeptor für HGF
COX-2	Cyclooxygenase-2
CXC-Chemokine	Chemokine, bei denen die ersten beiden Cysteinreste in der Aminosäuresequenz nicht direkt aufeinander folgen
Cytochrom c	= Apaf-2 = e <sup>-</sup> -Transporter in der Atmungskette der Zelle, wird von Mitochondrien zur Einleitung der Apoptose ausgeschüttet

## D

DED	Death effector domain
DEV D	Aminosäurenrest Asp-Glu-Val-Asp an Caspase3
DFF45	DNA-fragmentation-factor 45
DIABLO	= Smac
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethyl sulfoxid

## E

EIB-19K	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptoseinhibitor
---------	---

## F

FADD	Fas associated death domain = MORT 1
Fas	= CD95 = APO-1 = Mitglied der TNF-Rezeptor Familie
FasL	Fas Ligand
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FLAME	FADD-like anti-apoptotic molecule = c-FLIP = I-FLICE = Casper = Cash = CLARP = MRIT = Usurpin
Flice	Fadd-like ICE = Caspase8

## G

Granzym B	Serinprotease in den Granula der cytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen
-----------	---

## H

HBSS	Hank's balanced salt solution
Hela Cells	Human cervical carcinoma cells
HGF	hepatocyte growth factor
hIAP	Humanes IAP
Hrk	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor

HSP	Heat shock protein
HtrA2	= Omi; Gegenspieler von c-IAP1, c-IAP2 und XIAP
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
<b>G</b>	
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
<b>I</b>	
ICAM	Intracellular adhesion molecule
ICE	Interleukin-1 $\beta$ converting enzyme = Caspase1
I-Flice	Inhibitor of Flice = c-FLIP = Casper = Cash = CLARP = FLAME = MRIT = Usurpin
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
I $\chi$ B	Inhibitor von NF $\chi$ B
IKK	I $\chi$ B Kinase Komplex
IMDM	Iscoe's modified dulbecco's medium
iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthase
<b>K</b>	
KS-Bcl-2	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptoseinhibitor
<b>L</b>	
L-Glut.-Pen.-Strep	L-Glutamin-Penicillin-Streptomycin
Livin	Mitglied der IAP-Familie
LMW5-HL	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptoseinhibitor
LPG	Lipophosphoglykan
<b>M</b>	
M-CSF	Makrophagen Wachstumsfaktor
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1, Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptoseinhibitor
MDBK	Madin-Darby bovine kidney cells
ML-IAP	melanoma inhibitor of apoptosis protein
MRIT	Mach related inducer of toxicity = c-FLIP = I-FLICE = Casper = Cash = CLARP = FLAME = Usurpin
<b>N</b>	
NAIP	Neuronal apoptosis inhibitory protein
NF- $\chi$ B	Transkriptionsfaktor: nuclear factor- $\chi$ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxid
Noxa	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
NR-13	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptoseinhibitor
<b>O</b>	
Omi	= HtrA2; Gegenspieler von c-IAP1, c-IAP2 und XIAP
ORF16	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptoseinhibitor
<b>P</b>	
P53	Produkt eines Tumor Supressor Gens, das die Apoptose fördert
PARP	Poly-ADP-ribose-polymerase

PBS	Phosphate buffered saline
Perforin	Protein, das hauptsächlich von cytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen sezerniert wird und Poren in die Zielzelle formt
p.i.	post infectionem
PKC $\delta$	Proteinkinase C delta
p.o.	per os
Puma	Mitglied der Bcl-2-Familie, Apoptosepromotor
PUVEC	porcine umbilical vein endothelial cells
<b>R</b>	
R-110	Rhodamin-110
RT	Raumtemperatur
<b>S</b>	
Smac	second mitochondrial activator of caspases = DIABLO
Survivin	Mitglied der IAP-Familie
<b>T</b>	
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
TOTO-3	Farbstoff, der Nukleinsäuren färbt
TRADD	TNF-receptor related I associated death domain
Traf-1 bis 6	TNF receptor associated factor-1 bis 6, Signaltransduktor, der mit dem cytosolischen Domäne des TNF-Rezeptors assoziiert ist
TRAIL	TNF-receptor related apoptosis inducing ligand
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling, Nachweisverfahren zur Spätaoptose
<b>U</b>	
Usurpin	= c-FLIP = I-FLICE = Casper = Cash = CLARP = FLAME = MRIT
<b>V</b>	
VCAM	Vascular cellular adhesion molecule
<b>X</b>	
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
XIF1	XIAP associated factor 1

## 1 Einleitung

Die Eimeriose des Rindes ist eine weltweit vorkommende Erkrankung, die von 21 verschiedenen *Eimeria*-Arten ausgelöst werden kann, wovon die pathogensten Arten *E. bovis* und *E. zuernii* sind (Pellerdy, 1974, Sahlinger 1977). Bei Kälbern und Jungtieren führen Infektionen zu einer katarrhalischen und hämorrhagischen Typhlocolitis, die zumeist fieberfrei verläuft (Bürger, 1983). In schweren Fällen kann eine *Eimeria*-Infektion beim Rind zum Tode führen. Allerdings sind hauptsächlich solche Faktoren, wie schlechte Futterverwertung und daraus resultierende, geringe Gewichtszunahme für die wirtschaftlichen Verluste verantwortlich (Gräfner et al., 1985).

*E. bovis* gehört zu den intrazellulären Parasiten und vollzieht seine erste Schizogonie in Endothelzellen. Hierdurch kommt es zu einer enormen Größenveränderung und Umstrukturierung der Zelle. Zellstress ist als Auslöser des programmierten Zelltodes bekannt. Da sich *E. bovis* aber bis hin zur Merozoitenfreisetzung über mehr als 2 Wochen in der Zelle entwickelt, kann der Erreger offenbar die Immunantwort des Wirtes unterwandern und die sog. Apoptose außer Kraft setzen.

Die Apoptose kann über drei verschiedene Wege in der Zelle eingeleitet werden. Hierbei reguliert ein Netzwerk aus Apoptoseinhibitoren und -promotoren den Ablauf des programmierten Zelltodes. Für andere Protozoen wie *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Plasmodium*, *Theileria*, *Trypanosoma*, *Leishmania* und *Nosema* wurden schon eine Inhibition der Wirtszellapoptose beschrieben und die Aktivierung verschiedener Apoptoseinhibitoren nachgewiesen (Palmer et al., 1997; Künzi et al., 1997; Manna et al., 1999; Scanlon et al., 1999; Clark et al., 1999; Cole et al., 2000; Chuenkova et al., 2000; Hall 2000; Göbel et al., 2001; Chen et al., 2001; Aga et al., 2002; Molestina et al., 2003 Del Cacho et al., 2004; Lüder et al., 2005; van de Sand et al., 2005; Lisi et al. 2005; Petersen 2006).

In vorliegender Arbeit wird unter Verwendung eines *in vitro*-Systems untersucht, ob auch *E. bovis* während seiner intrazellulären Entwicklung bis hin zum Meronten I fähig ist, die Apoptose der Wirtszelle zu inhibieren. Des Weiteren wird geprüft, ob die Expression der Apoptoseinhibitoren „cellular inhibitor of apoptosis protein1“ (c-IAP1), „cellular Flice inhibitory protein“ (c-FLIP) und „B-cell-lymphoma-2“ (Bcl-2) in *E. bovis*-infizierten Zellen eine Rolle bei der Inhibition der Apoptose spielt.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 *Eimeria bovis*

#### 2.1.1 Vorkommen und Bedeutung von *Eimeria bovis*

*Eimeria bovis* ist neben *E. zuerni* die pathogenste Kokzidienart des Rindes (Sahlinger, 1977). Vor allem bei Kälbern kann diese Art unter epidemiologisch ungünstigen Bedingungen schwere, hämorrhagische Enteritiden im Dickdarm hervorrufen, die im Einzelfall zum Tod des Tieres führen können, immer aber mit erheblichen Entwicklungsstörungen und für den Tierhalter mit wirtschaftlichen Verluste verbunden sind (Bürger, 1983; Gräfner, 1985).

#### 2.1.2 Entwicklungszyklus von *Eimeria bovis*

Die Vermehrung von *Eimeria bovis* folgt dem allgemeinen Entwicklungsmuster der Gattung *Eimeria*. Der Lebenszyklus, der in der parasitischen Phase eine strenge Organspezifität erkennen lässt, umfasst drei Schritte: Sporogonie, Schizogonie und Gamogonie. Dabei läuft ein Teil der Entwicklung exogen ab (Sporogonie), die anderen Schritte erfolgen endogen (Schizogonie, Gamogonie).

Die mit der Fäzes in die Außenwelt gelangenden Oozysten enthalten Sporonten, welche in einigen Tagen durch Sporogonie zu vier Sporozysten pro Oozyste mit je zwei Sporozoiten reifen. Die Sporulation der Oozyste ist von der Feuchtigkeit und der Außentemperatur abhängig. Bei ausreichender Sauerstoffversorgung und bei einer Temperatur von 25-28° C dauert dieser Prozess zwei bis drei Tage (Ernst und Benz, 1981). Die endogene Entwicklung beginnt mit der oralen Aufnahme der sporulierten Oozyste durch das Rind. Unter Einfluss von Gallensäuren und Trypsin exzystieren die Sporozoiten und invadieren Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren der Villi des kaudalen Dünndarmabschnittes (Nyberg und Hammond, 1964). Nach der Invasion kommt es zur Ausbildung einer intrazytoplasmatisch gelegenen parasitophoren Vakuole (PV). Innerhalb dieser findet die erste Schizogonie statt, bei der 280-300 µm große Makroschizonten entstehen, und die nach 14-18 Tagen abgeschlossen ist. Diese ersten Schizonten enthalten bis zu 100.000 Merozoiten (Hammond et al., 1964).

Ist der Makroschizont gereift, werden die Merozoiten frei und dringen in Epithelzellen der Krypten von Caecum und Colon ein. Nun beginnt die zweite Schizogonie, aus der die zweite Merozoitengeneration entsteht (Hammond et al., 1963), welche sich wiederum zu geschlechtlich determinierten Mikro- und Makrogamonten differenzieren. Die

Mikrogamonten bringen bewegliche Mikrogametozyten hervor, die je einen reifen Makrogameten befruchten können. So entstehen über Syngamie letztlich die unsporulierten Oozysten, die nach 14-18 Tagen Präpatenz durch den Kot in die Außenwelt gelangen.

### 2.1.3 Geeignete Wirtszelllinien zur Etablierung eines *in vitro*-Systems für *E. bovis*

Eine essentielle Voraussetzung für die Klärung von Fragestellungen, die sich mit der Parasit-Wirtszellinteraktion befassen, ist die Etablierung eines geeigneten *in vitro*-Systems. Ein wichtiges Kriterium hierbei ist, dass sich der Parasit möglichst ähnlich entwickelt wie unter *in vivo*-Bedingungen.

Die Versuche *E. bovis in vitro* zu etablieren begannen bereits früh und bedienten sich verschiedener Zelltypen wie „Madin-Darby bovine kidney cells“ (MDBK), Vero-Zellen, fetaler Gastrointestinalzellen aus dem Rind („bovine fetal gastrointestinal cells“: BFGC), boviner Endothelzellen aus der Umbilikalvene („bovine umbilical vein endothelial cells“: BUVEC), Endothelzellen aus Nabelschnüren vom Menschen („human umbilical vein endothelial cells“: HUVEC), und vom Schwein („porcine umbilical vein endothelial cells“: PUVEC) und boviner, lymphatischer Endothelzellen aus der Milz („bovine spleen lymphatic endothelial cells“ BSLEC) (Hermosilla et al., 2001).

Die am besten geeigneten Wirtszelllinien für *E. bovis* dürften derzeit die von Hermosilla et al. (2001) beschriebenen, immortalisierten BFGC und BUVEC sein. Beide Zelllinien lassen die Infektion und komplette Entwicklung von *E. bovis* zu Merozoiten I zu. Allerdings handelt es sich bei BUVEC um eine sehr empfindliche Zelllinie, die auch bei sorgsamer Behandlung zu spontanem Absterben und Ablösen des Zellrasens neigt (Hermosilla et al., 2001).

Auch Vero-Zellen werden von *E. bovis*-Sporozoiten infiziert und es kommt zur Ausbildung einer PV. Der Sporozoit überlebt offenbar für ca. 21 Tage in der Zelle, es erfolgt jedoch keine Weiterentwicklung (Hermosilla et al., 2001).

### 2.1.4 Bisherige *in vitro*-Untersuchungen zur Interaktion von *Eimeria bovis*-Sporozoiten mit ihren Wirtszellen

*E. bovis*-Sporozoiten benötigen *in vivo* für ihre langandauernde Weiterentwicklung zu Makroschizonten Endothelzellen der zentralen Lymphkapillaren (Hammond et al., 1964). Auf der Suche nach einer adäquaten Wirtszelle, kommt es bei *E. bovis* zur sog. Transmigration durch Zellen. Hierbei wird die Zellmembran zwar vom Sporozoiten beim Eindringen in die Zelle perforiert, doch kommt es jeweils zur sofortigen Reparatur, sodass die Zelle vital bleibt. Behrendt et al. (2004) vermuten, dass sich der Parasit dadurch eine effiziente Methode zum



Durchwandern von Geweben angeeignet hat. Bei der eigentlichen Invasion von *E. bovis* Sporozoiten in die Wirtszelle spielen die sekretorischen Organellen des apikalen Komplexes der Sporozoiten eine wichtige Rolle. Dazu gehören Mikromeren, Rhoptrien und dichte Granula. Mikromerenproteine werden unmittelbar vor und während der Invasion sezerniert, können miteinander interagieren und adhäsive Komplexe bilden. Dadurch kann der Sporozoit an die Wirtszellmembran binden (Tomley et al., 2001). Durch eine Translokation des Komplexes vom apikalen zum distalen Pol des Parasiten wird dem Sporozoiten eine Fortbewegung an der Zellmembran ermöglicht (Bumstead et al., 2000). Die Rhoptriensekretion findet während des Eindringens von *E. bovis* statt. Bei diesem Vorgang wird die Wirtszellmembran eingestülpt und eine PV ausgebildet. Die sezernierten Rhoptrienproteine modifizieren dabei die eingestülpte Wirtszellmembran zur Membran der PV (Mordue et al., 1999). Nach dem Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle findet die Sekretion von Proteinen aus den dichten Granula statt (Leriche et al., 1990). Bei anderen *Eimeria spp.* wurden darunter Proteaseinhibitoren (Morris et al., 2002), Nukleosidtriphosphat-Hydrolasen (Sibley et al., 1994) und dichte Granula-spezifische Proteine charakterisiert (Cesbron-Delauw et al., 1994; Fischer et al., 1998; Carey et al., 2000; Adjogble et al., 2004). Allerdings ist die Funktion der Proteine noch nicht vollständig geklärt. Einige Granula-spezifische Proteine werden in die Membran der PV integriert, andere verbleiben zwischen der PV-Membran und der Pellikula des Sporozoiten (Lecordier et al., 1993). Nach dem Eindringen der Sporozoiten in die eigentliche Wirtszelle vollzieht sich eine Formveränderung. Innerhalb der PV rundet sich der Sporozoit ab und wird nun als Trophozoit bezeichnet. Die Trophozoiten verbleiben zunächst augenscheinlich unverändert, bis sie nach 5-7 Tagen mit einer massiven Proliferation beginnen, die nach 14-18 Tagen in bis zu 300 µm große Makroschizonten mündet (Hammond et al., 1964).

Endothelzellen sind nach Aktivierung in der Lage, eine Vielzahl proinflammatorischer und immunmodulatorischer Moleküle zu synthetisieren. Dazu gehören u.a. Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Prostaglandine und eine induzierbare Stickoxid (NO)-Synthase (iNOS) (Tedder et al., 1995; Ebnet et al., 1998), die indirekt oder direkt (z.B. NO) auf den sich entwickelnden Parasiten einwirken können.

Nach dem Eindringen der Sporozoiten in die Endothelzelle reagiert diese *in vitro* mit einer Hochregulation der Transkription der P-Selektin- und E-Selektingene. P-Selektin wird schon nach 30min hochreguliert und fällt nach 2 h langsam wieder ab. E-Selektin hingegen steigt bis auf das 25fache nach 4 h an und fällt dann wieder ab. Diese Adhäsionsmoleküle vermitteln frühe, reversible Kontakte zwischen Endothelzellen und Leukozyten (Tedder et al., 1995;

Ebnet et al., 1998; Hermosilla et al., 2006; Taubert et al., 2006). Eine wenn auch schwächere Induktion findet sich für das „vascular cellular adhesion molecule-1“ (VCAM-1) und das „intracellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1). Dabei handelt es sich um Moleküle, die für die feste Adhäsion von Entzündungszellen an aktiviertes Endothel verantwortlich sind (Tedder et al., 1995; Ebnet et al., 1998, Hermosilla et al., 2006; Taubert et al., 2006). Folgerichtig kommt es in der Frühphase der Infektion durch das Auftreten der Adhäsionsmoleküle *in vitro* zur Bindung von neutrophilen Granulozyten an die Endothelzellen (Hermosilla et al., 2006). Diese Reaktionen lassen allerdings relativ früh wieder nach, d. h. es kommt zum kontinuierlichen Rückgang der angesprochenen Genexpression bis mit Beginn der intrazellulären Proliferation der Parasiten wieder Kontrollwerte erreicht werden (Hermosilla et al., 2006). Offensichtlich handelt es sich zumindest teilweise um einen aktiven Eingriff des Parasiten in die Genregulation der Wirtszelle, denn auch eine „tumor necrosis factor- $\alpha$ “ (TNF- $\alpha$ )-induzierte Hochregulation der entsprechenden Gentranskripte und die resultierenden Adhäsion von neutrophilen Granulozyten wird in infizierten Endothelzellen signifikant beeinträchtigt (Hermosilla et al., 2006). Der Gedanke liegt nahe, dass damit eine bestimmte Evasionsstrategie des Erregers zum Ausdruck kommt, mit der er seine lange Persistenz in der Wirtszelle sichert. Auch die Beobachtung, dass bei den sich erheblich schneller entwickelnden (2-3 Tage), nahe verwandten Erregern *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* derartige Reaktionen unter gleichen Versuchsbedingungen ein deutlich stärkeres Ausmaß erreichen, spricht dafür (Taubert et al., 2006).

Ähnliche Verhältnisse finden sich auch für die Transkription weiterer Gene, die für Moleküle kodieren, die gleichfalls eine wichtige Rolle bei der angeborenen Infektabwehr spielen. Dies gilt für die Proteinfamilie der Chemokine, die für die Aktivierung und Chemotaxis der Leukozyten verantwortlich ist (Taubert et al., 2006). Außerdem regulieren sie zusammen mit Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren entzündliche Prozesse (Zusammenfassung Locati et al., 2002). Auch hierbei weist eine mit *E. bovis* infizierte Zelle nur eine schwach gesteigerte Chemokinsynthese auf, während sich schnell proliferierende Erreger wie *T. gondii* und *N. caninum* abermals als hoch potente Induktoren der Chemokinsynthese in infizierten Endothelzellen zeigen. Wachstumsfaktoren wie der granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF), die die Proliferation und Reifung von Leukozyten regulieren, steigen im Falle von *E. bovis* im Gegensatz zu *T. gondii* nur minimal an (Taubert et al., 2006). Der Einfluss von Kokzidien auf die Prostaglandinsynthese endothelialer Wirtszellen untersuchten Taubert et al. (2006) ebenfalls

anhand der Transkriptionsraten des für die Cyclooxygenase-2 (Cox-2) kodierenden Gens. Prostaglandine induzieren und steigern bei Infektionen entzündliche Prozesse, hemmen die Aktivierung von Makrophagen, vermindern die Synthese von Th<sub>1</sub>-Zytokinen und verbessern die Th<sub>2</sub>-Reaktion. Cox-2 ist eines der Schlüsselenzyme bei ihrer Synthese (Zhang et al., 2001). Auch für die Cox-2-Synthese ließen sich nach Infektionen mit *E. bovis*, *T. gondii* und *N. caninum* Unterschiede *in vitro* erkennen, die dafür sprechen, dass *E. bovis* in Vergleich zu den anderen Kokzidien entzündliche Reaktionen an seinem Ausbreitungsort weitgehend unterdrückt. Nach diesen Untersuchungen von Taubert et al. (2005, 2006) und Hermosilla et al. (2006) ist *E. bovis* also offensichtlich in der Lage über die Beeinflussung der Wirtszelle das Immunsystem in einer für seine Entwicklung günstigen Weise zu modulieren.

Abgesehen von solchen direkten oder indirekten Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus entstehen auch mit der langen Entwicklungs- und Reifezeit des 1. Schizonten von mehr als 2 Wochen (Hammond et al., 1963) besondere Anforderungen an die Wirtszelle. Da jedoch ein zeitlich ausreichendes Überleben der Wirtszelle die Grundvoraussetzung für die Entwicklung des Parasiten ist, sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob *E. bovis* zusätzlich die Apoptosefähigkeit seiner Wirtszelle beeinflusst, die unter anderem einen Abwehrmechanismus gegen intrazelluläre Erreger darstellt. Diese Fragestellung ist insbesondere interessant, wenn man sich vor Augen hält, dass es mit dem Wachsen des Makroschizonten zu einer erheblichen, morphologischen Veränderung der Zelle kommt, die eine Umgestaltung des Cytoskeletts, eine enorme Vergrößerung der Wirtszelle selbst und einen Umbau der Zelloberfläche beinhaltet, was unweigerlich Stress für die Zelle darstellen sollte (Hermosilla et al., 2006). Zellstress ist wiederum dafür bekannt, als ein potenter Apoptose-Induktor zu fungieren.

Zwar gehören vaskuläre Endothelzellen zu langlebigen Zellen - ihre Überlebenszeit beträgt zwischen 23 und 47 Tagen (Hobson, 1982), doch sind unter dem Infektionsstress andere Bedingungen zu erwarten.

## **2.2 Apoptose**

### **2.2.1 Apoptose und Nekrose**

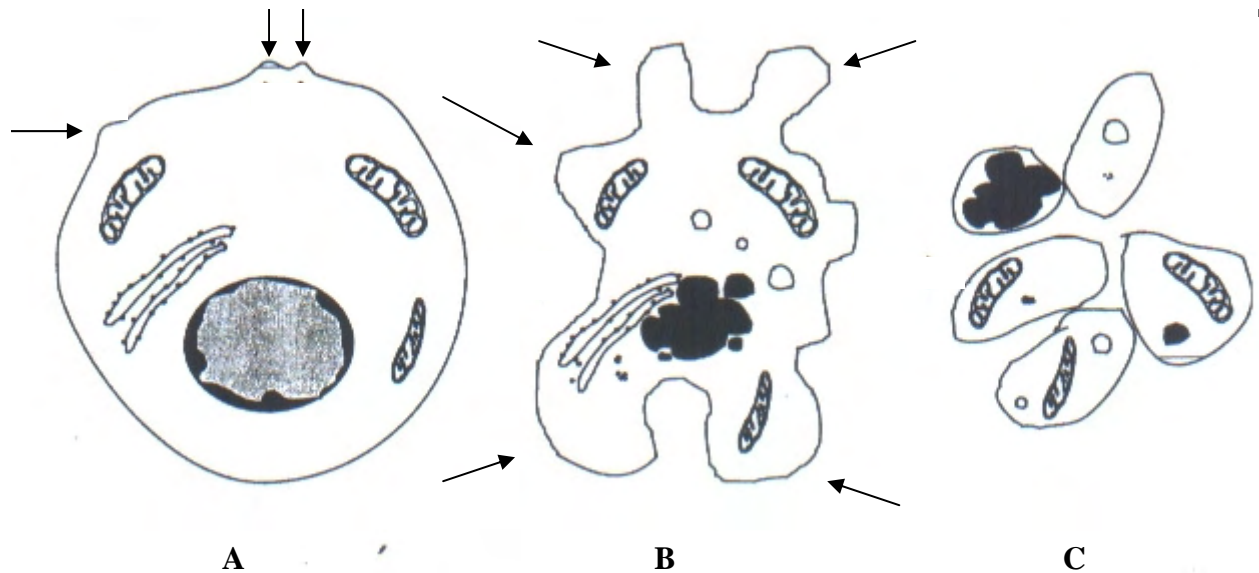
Sowohl bei der Apoptose als auch bei der Nekrose kommt es zum Tod von Zellen. Im Falle der Apoptose handelt es sich um einen physiologischen Mechanismus, der das Absterben „alter“ Zellen reguliert und somit für den Vorgang einer Zellerneuerung im Körper essentiell

ist. Im Gegensatz dazu ist der Zelltod im Rahmen der Nekrose immer ein pathologischer Vorgang, der stets mit einer Entzündungsreaktion einhergeht.

Das Wort Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod, kommt aus dem griechischen (apo = ab, los, weg; ptosis = Senkung) und bedeutet „herabfallen“. Dieser Namensgebung liegt der Vergleich mit niederfallendem Laub im Herbst zu Grunde. Der Begriff wurde 1972 von Kerr geprägt, der das Phänomen zunächst „shrinkage necrosis“ nannte (Kerr, 1972; Majno et al., 1995). Die Apoptose spielt mit den sich anschließenden, vielfältigen Re- und Umstrukturierungen nicht nur in der embryonalen und fetalen Entwicklung eine große Rolle, sondern auch im adulten Körper. Der erwachsene Körper eines Menschen verfügt z. B. über ca.  $5 \times 10^9$  neutrophile Granulozyten, die permanent im Blut zirkulieren. Da diese Zellen eine mittlere Lebensdauer von nur einem Tag haben, ist es wichtig, dass die „alten“ Zellen eliminiert werden. Dazu leiten sie ihren programmierten Zelltod ein, sodass die Anzahl dieser Zellen im Blut bemerkenswert konstant bleibt. Ein weiteres Beispiel sind die zyklischen Umbauten der Ovarien oder der Rückgang temporärer Hyperplasien der Leber auf ihre Normalgröße (Zusammenfassung bei Cohen et al., 1992 und Kanduc et al., 2002). In immunologischer Hinsicht erfüllt die Apoptose eine weitere wichtige Aufgabe. Bakteriell, viral und parasitär infizierte Zellen leiten unter bestimmten Bedingungen ihren eigenen Tod ein und bilden so ein wichtiges Element in der Verteidigung gegen Infektionen (Heussler et al., 2001). Des Weiteren werden auch Tumorzellen auf diese Art und Weise eliminiert (Kanduc et al., 2002).

Morphologisch fällt eine apoptotische Zelle zunächst durch eine Schrumpfung auf, weshalb die Apoptose, wie oben erwähnt, anfänglich „shrinkage-necrosis“ genannt wurde. Zum Beispiel zeigt sich bei Thymuszellen ein Volumenverlust von 30% (Zusammenfassung bei Cohen et al., 1992). Dies wird über Enzymaktivitäten der sog. Caspasen vermittelt, in deren Verlauf eine Lyse des Zytoskeletts und eine DNA-Fragmentierung eingeleitet werden, die wiederum zur Kondensation des Zellkerns führt. Das Mitochondrium verliert seine Funktion und die Zelle schrumpft, rundet sich ab und löst sich aus ihrem Zellverband (Kerr et al., 1972; Uchiyama et al.; 2001, Zusammenfassung bei Kanduc et al., 2002). Phosphatidylserine, die an der Zellmembran verankert sind und auf der Zytosolseite liegen, werden evertiert und markieren die Zelle für Phagozyten. Nun kann die Zelle oder ihre abgeschnürten Zellfragmente, auch „apoptotic bodies“ genannt, (Abb.1(C)). von Phagozyten oder auch von Nachbarzellen durch Endozytose beseitigt werden. Bevor sich die Fragmente von der Zellmembran abschnüren, bilden sich Ausbuchtungen an der Membran, was im Allgemeinen als „membrane blebbing“ bezeichnet wird (Abb.1(B)). Ein wichtiges Merkmal der Apoptose

ist, dass bei dem Vorgang die Zellmembran stets intakt bleibt und sich keine Entzündungsreaktion zeigt (Clarke et al., 1990; Columbano, 1995, Zusammenfassung bei Kanduc et al., 2002).



**Abbildung 1**

**Schematische Darstellung der nacheinander ablaufenden, morphologischen Veränderungen während der Apoptose**

(A) erste apoptotische Veränderungen einer Zelle mit Kondensation des Zellkerns und Bildung erster „blebs“ (Pfeile). (B) Fragmentierung des Zellkerns, die Zellorganellen bleiben intakt, Freisetzung von Ribosomen, fakultatives Auftreten von Vakuolen. Es kommt zu deutlichem Aufwerfen der Zellmembran („membrane blebbing“ (Pfeile)). (C) Abschnüren von Zellfragmenten, die auch „apoptotic bodies“ genannt werden (modifiziert nach Häcker 2000).

„Nekrose“ kommt wie „Apoptose“ aus dem Griechischen und bedeutet „Tod, Absterben“ und beschreibt einen pathologischen Niedergang von Zellen. Dieser Begriff wurde bereits in den Schriften des griechischen Anatomen und Arztes Galen 129-216 nach Christus verwendet. Damals wurden damit Gewebsveränderungen beschrieben, die heute als Gangrän bezeichnet werden. Im Laufe der Jahrhunderte wurde die Bezeichnung „Nekrose“ bis zum heutigen Tag immer wieder neu definiert (Majno et al., 1995). Allgemein betrachtet lässt sich sagen, dass viele Faktoren wie z. B. Gifte, Bakterien, Hitze, Radioaktivität, Sauerstoff- oder Nährstoffmangel Ursachen für diesen Zelltod sein können, der stets mit einer Entzündungsreaktion einhergeht. Es ist nicht möglich den Vorgang der Nekrose zu stoppen, da der Schaden, den die Zelle genommen hat, zu groß ist. Anders verhält es sich mit der

Apoptose. Wie später näher erklärt wird, ist es bis zum Aktivieren der Effektorcaspasen möglich, diesen Vorgang vorzeitig zu beenden, sodass die Zelle auch nach dem Einleiten der Apoptose überleben kann (Kanduc et al., 2002).

Beim nekrotischen Zelniedergang kommt es, zum Anschwellen des Zellkerns und zur sog. Kernwandhyperchromatose. Anders als bei der Apoptose zeigen sich eine Karyolyse sowie ein Anschwellen der Zellorganellen. Die Zellwand verliert ihre Integrität, sodass sich die Zelle aus ihrem Verband löst und Zellbestandteile in den Interzellularraum sickern. Dies verursacht stets eine entzündliche Reaktion (Saraste, 1999). Nach Kanduc et al. (2002) kann man die Nekrose nicht als einen passiven Vorgang bezeichnen und im Gegensatz dazu die Apoptose als einen aktiven, da beide als enzymatisch katalysierte, biochemische Reaktion zu verstehen sind.

### 2.2.2 Die Signalkaskaden der Apoptose

Die Signalkaskade der Apoptose beinhaltet ein kompliziertes Netzwerk aus einer Vielzahl von Molekülen, die aktivierend und hemmend wirken. Bis heute ist sicherlich nur ein Teil dieser Moleküle bekannt. Zielmoleküle der bei der induzierten Apoptose ablaufenden Signalkaskade sind die sog. Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Diese Moleküle sind letztlich für den Abbau der Zelle verantwortlich. Bisher wurden 3 unterschiedliche Signalwege zur Aktivierung der Effektorcaspasen beschrieben.

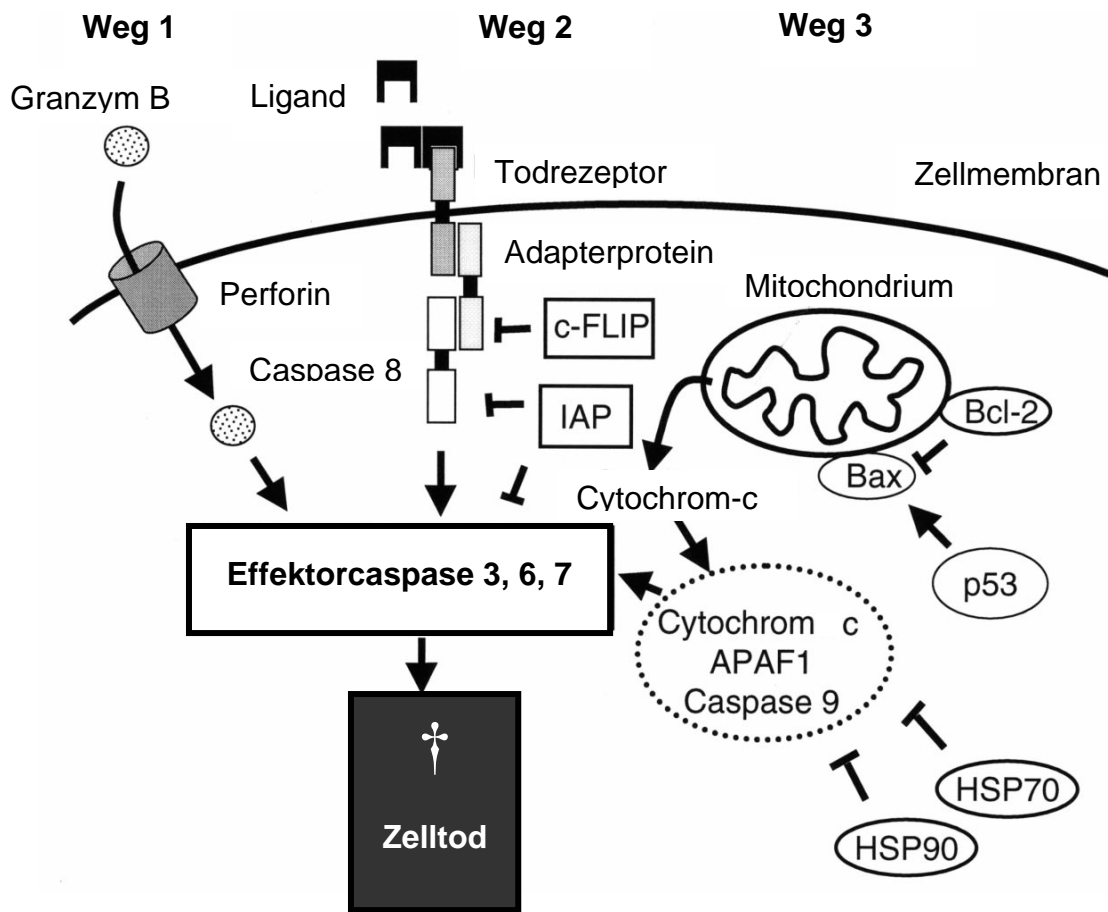


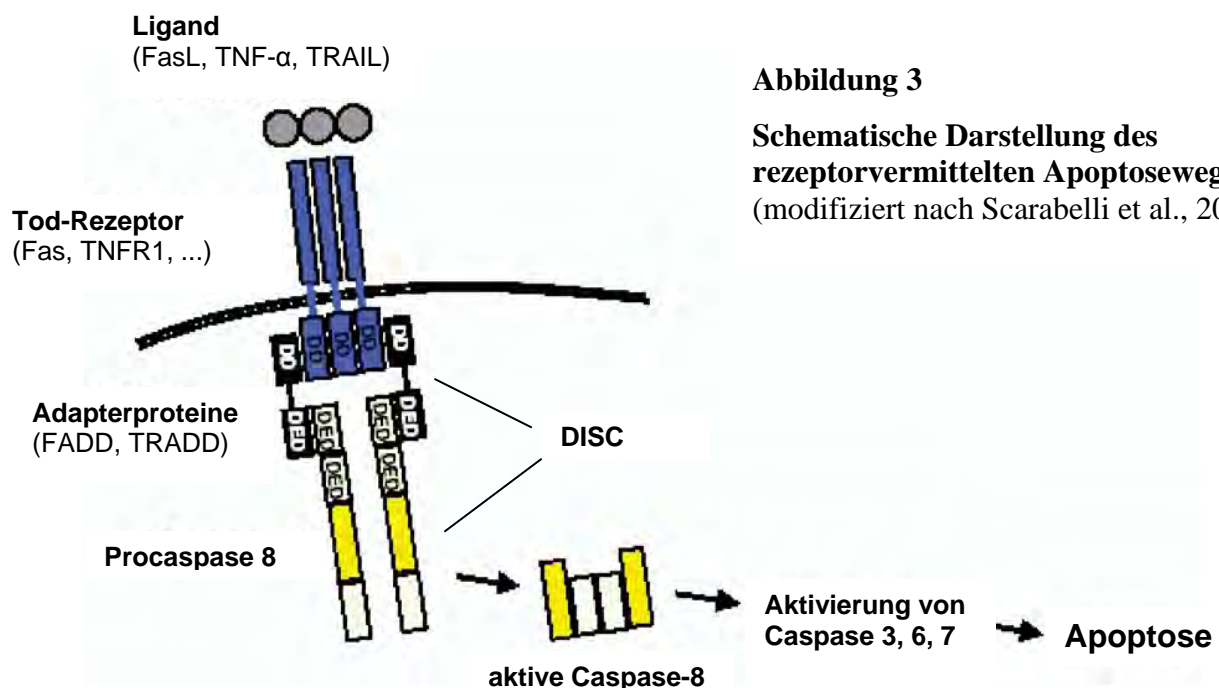
Abbildung 2

### Die drei klassischen Wege der Apoptose und ihre Regulatoren

**Weg 1:** Perforin bildet eine Pore in der Membran, Granzym B aktiviert direkt die Effektorcaspasen 3. **Weg 2:** ein entsprechender Ligand bindet an einen Rezeptor der „tumor necrosis factor“- (TNF) Rezeptorfamilie, ein Adapterprotein, das „Fas associated death domain protein“ (FADD) oder das „tumor necrosis factor receptor associated death domain protein“ (TRADD), bildet zusammen mit Caspase 8 den sog. „death inducing signaling complex“ (DISC) und es kommt zur Aktivierung der Effektorcaspase-3. Bei **Weg 3** stimuliert p53 die Ausschüttung von Cytochrom-c aus dem Mitochondrium, indem es Bax an die Mitochondrienmembran rekrutiert. Cytochrom-c bildet mit APAF-1 und Caspase 9 das sog. Apoptosom, das die Effektorcaspase 3 aktiviert. Inhibitoren der Apoptose sind Mitglieder der IAP-Familie, FLIP, HSP 90, HSP 70 und Bcl-2. Siehe auch Abschnitt 3.5. (modifiziert nach Heussler et al., 2000)

Der erste Weg wird auch der Granzym B/Perforin-Weg genannt. Granzym B ist eine Aspartyl-Serin-Protease, die in den Granula der zytotoxischen T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) enthalten ist (Shi et al., 1992). Nach Aktivierung dieser Immunzellen werden Granzym B und Perforin freigesetzt. Perforin formt einen Kanal in die Membran der Zielzelle, sodass Granzym B in das Zytosol gelangt. Dort spaltet und aktiviert es direkt die Effektorcaspase 3 (Atkinson et al., 1998).

Der zweite Signalweg ist ein rezeptorvermittelter Weg. Die involvierten Rezeptoren gehören zur Familie der „tumor necrosis factor“ (TNF)-Rezeptoren. Die wichtigsten Mitglieder dieser Familie sind der TNF-Rezeptor 1 und der Fas-Rezeptor (APO-1, CD95) (Hofman, 1999). Bindet ein entsprechender Ligand, der auch von der Zielzelle selbst stammen kann, an den Rezeptor, wird Procaspase 8 von der Membran in das Zytosol rekrutiert. Dort bindet sie an ein Adapterprotein, das „Fas associated death domain protein“ (FADD) oder das „TNFR-associated death domain protein“ (TRADD), um den sogenannten „death inducing signaling complex“ (DISC) zu bilden. DISC bzw. die aktive Caspase 8 kann wiederum direkt die Effektorcaspase 3 aktivieren (Irmeler et al, 1997).

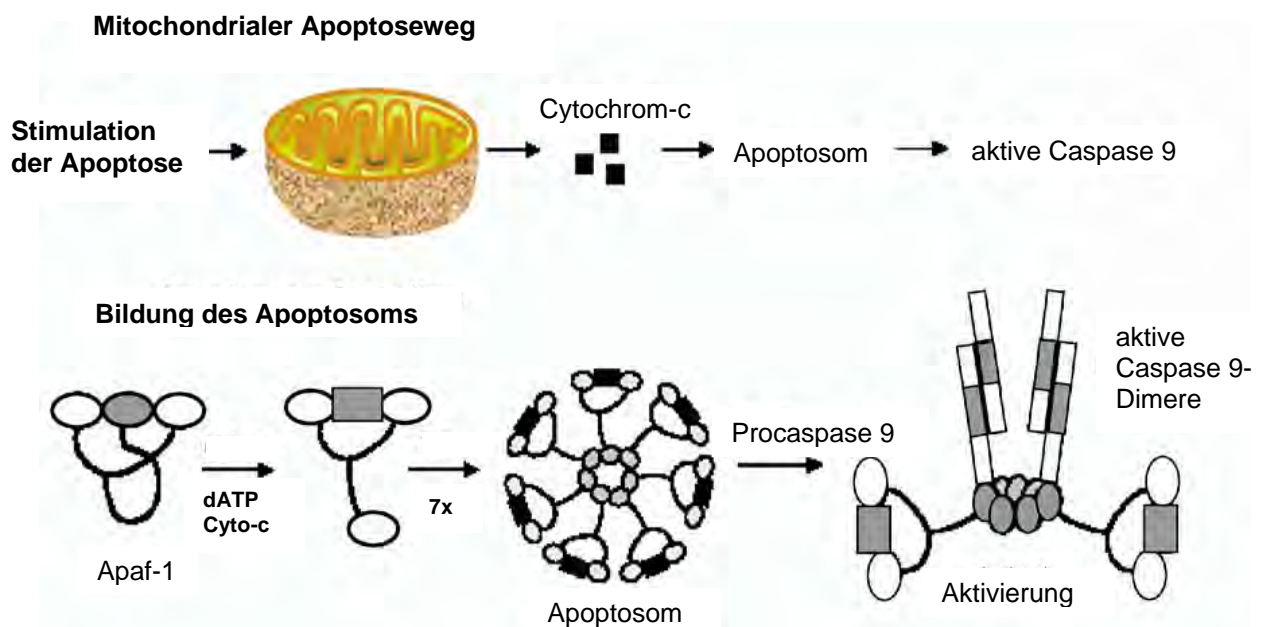


**Abbildung 3**

**Schematische Darstellung des rezeptorvermittelten Apoptoseweges**  
(modifiziert nach Scarabelli et al., 2006)



Des Weiteren wird der „mitochondriale“ oder „innere“ Signalweg beschrieben, wobei Cytochrom-c aus den Mitochondrien in das Zytosol sezerniert wird (Budihardjo et al., 1999). Eingeleitet wird dieser Prozess hauptsächlich durch allgemeine DNA-Schäden und zellulären Stress. Dies stimuliert das Tumor Suppressor Protein p53, welches „Bcl2 associated x protein“ (Bax), „Bcl-xL/Bcl2 associated death promoter“ (Bad) und „BH3 interacting domain“ (Bid) an die äußere Mitochondrienmembran rekrutiert. Bax fördert die Cytochrom-c-Freisetzung (Vousden et Woude, 2000), welches seinerseits an den „apoptosis protease activating factor 1“ (APAF-1) bindet (Cosulich et al., 1999). Zusammen mit Caspase 9 bilden Cytochrom-c und APAF-1 das sog. „Apoptosom“ (Purring-Koch und Mc Lendon, 2000), welches wiederum direkt Caspase-3 aktiviert.



**Abbildung 4**

**Oben:** Darstellung der Vorgänge beim mitochondrialen Apoptoseweg bis zur Aktivierung von Caspase 9.

**Unten:** Differenzierte Darstellung des Apoptosoms mit Cytochrom-c, Apaf1 und Caspase 9 (modifiziert nach Scarabelli et al., 2006)

Obwohl diese drei Wege unabhängig voneinander stattfinden, gibt es einige Interaktionen. Ist der rezeptorvermittelte Weg auf der Ebene von Caspase 8 angelangt, wird Bid aktiviert, welches eine Bindeglied zu Bax darstellt, das wiederum die Freisetzung von Cytochrom-c vermittelt (Li et al., 1998; Luo et al. 1998) und somit zu einer Verstärkung des Signals führt. Unter bestimmten Umständen ist neben den drei klassischen Wegen der Apoptose ein weiterer Caspase-unabhängiger Weg möglich. Hierbei kommt es zu einer lysosomalen

Autophagie beschädigter oder auch intakter Organellen. Diese zellprotektive Maßnahme kann im programmierten Zelltod münden, wenn dieser Vorgang sehr massiv und/ oder lange andauernd ist (Scarabelli et al., 2006).

### 2.2.3 Caspasen und ihre Funktion

Caspasen gehören zu einer Familie von Proteasen, die ein Cystein in ihrem aktiven Zentrum haben und das Zielprotein an der Aminosäure Aspartat angreifen. In der Zelle liegen sie als inaktive Vorläufer, den Procaspasen, vor. Aktiviert werden sie durch andere Caspasen bzw. durch die oben beschriebenen Wege. Dazu wird ihre Prodomäne an Aspartat abgespalten (Earnshaw et al., 1999).

Man unterscheidet zwischen Initiator- und Effektorcaspasen. Zu den Initiatorcaspasen gehören die Caspasen 2, 8, 9 und 10, zu den Effektorcaspasen die Caspasen 3, 6 und 7. Insgesamt kennt man 14 Caspasen, wobei die Aufgaben der noch nicht genannten Caspasen in den Bereich der Zytokinaktivierung und Entzündungsreaktion gehören (Earnshaw et al., 1999; Zusammenfassung bei Shi, 2002). Wird eine Initiatorcaspase aktiviert, spaltet sie selbst weitere Procaspasen, sodass eine proteolytische Kaskade entsteht. Ist diese Kaskade auf der Ebene der Effektorcaspasen angelangt, werden neben der Aktivierung weiterer Proteine der eigenen Familie noch zusätzliche Aufgaben erfüllt (Saraste et al., 2000) wie die proteolytische Spaltung eines weiten Spektrums zellulärer Proteine, was letztendlich zum Tod der Zelle führt. Zu den bekannten zellulären Komponenten gehören Strukturproteine wie Aktin und Myosin, regulatorische Proteine wie die DNA-abhängige Proteinkinase, Inhibitoren der Desoxyribonuklease und andere proapoptotische Proteine und Caspasen. Die Spaltung des Inhibitors der Desoxyribonuklease „DNA-fragmentation-factor 45“ (DFF45) hebt seine inhibitorische Wirkung gegenüber DFF45 und der „caspase-activated desoxyribonuclease“ (CAD) auf. Dadurch werden während der Apoptose die Chromosomen in Nucleosomfragmente geteilt. Adhäsionsproteine, die die Zell-zu-Zellverbindungen aufrechterhalten, werden gespalten, sodass sich die betroffene Zelle aus ihrem Verband herauslösen kann (Zusammenfassung bei Shi, 2002).

### 2.2.4 Regulatoren der Apoptose

Die Entscheidung, ob eine Zelle in Apoptose gehen wird oder nicht, wird durch Apoptoseinhibitoren und Apoptosepromotoren reguliert.

Diese Mediatoren stellen die „**B-cell lymphoma-2**“ Familie (Bcl-2), die „**Inhibitor of Apoptosis Protein**“ Familie (IAP-Familie), die „**Heat Shock Proteins**“ (HSP), das „**cellular Fas-associated death domain like interleukin- 1-  $\beta$ - converting enzyme inhibitory protein**“ (c-FLIP), sowie die Regulatoren p53, „**Poly- ADP- Ribose- Polymerase**“ (PARP), der Transkriptionsfaktor „**nuclear factor kappa B**“ (NF- $\kappa$ B) und dessen Inhibitor I $\kappa$ B.

Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, agieren einige dieser Proteine nur pro- oder antiapoptotisch während andere, je nach Bedingung, beide Funktionen erfüllen können. Um diese komplexen Zusammenhänge besser zu verdeutlichen wird im Folgenden auf unterschiedliche Regulatoren eingegangen.

**Tabelle 1**  
**relevante Apoptoseregulatoren und ihre Funktion**

Familie/ Protein	proapoptotisch	antiapoptotisch
IAP Familie		√
I-Fllice	√	√
Bcl-2 Familie	√	√
HSP Familie	√	√
PARP	√	√
p53	√	
NF $\kappa$ B	√	√
I $\kappa$ B	√	√

#### 2.2.4.1 IAP-Familie

Zur IAP- Proteinfamilie gehören die Vertreter des **humanen** bzw. **x-chromosomal** gebundenen IAPs (hIAP/XIAP), das zelluläre IAP1 und 2 (c-IAP1, c-IAP2), „**neuronal apoptosis inhibitory protein**“ (NAIP), „**melanoma IAP**“ (ML- IAP), Bruce, Livin und Survivin (Duckett et al., 1996; Liston et al., 1996). Die Gemeinsamkeit dieser Proteine besteht in einer bis drei Kopien eines Motivs aus 70 Aminosäuren, der sogenannten **Baculovirus IAP repeat** Domäne (Bir-Domäne) und einer carboxyterminalen Ringdomäne (Johnson et al., 2000), wobei die Ringdomäne im Gegensatz zur Bir-Domäne nicht essentiell für die inhibitorische Wirkung der

Proteine ist (Deveraux et al., 1997; Roy et al., 1997; Takahashi et al., 1998). Zwischen den beiden beschriebenen Domänen befindet sich eine „**caspase recruitment domain**“ (CARD), die aber vermutlich nicht absolut notwendig ist, um eine Hemmung durchzuführen (Roy et al., 1997).

Die Vertreter c-IAP1, c-IAP2 und XIAP sind in der Lage, zentral in das apoptotische Geschehen einzugreifen. Alle drei können an die aktivierte Form der Effektorcaspasen 3 und 7 binden, um den programmierten Zelltod zu verhindern, nicht aber an deren Procaspasen (Roy et al., 1997; Deveraux et al., 1997). Zusätzlich können c-IAP1, c-IAP2 und XIAP zu ihrer oben erwähnten Funktion Procaspase 9 und deren aktivierte Form hemmen, sodass sie auch Einfluss auf den mitochondrialen Apoptoseweg haben (Bratton et al., 2001).

Es sind 3 Gegenspieler der IAPs bekannt, „**XIAP associated factor 1**“ (XIF1), „**second mitochondrial activator of caspases**“ (Smac, auch DIABLO genannt) und Omi, auch HtrA2 genannt. XIF1 ist ein nukleäres Protein, das XIAP als Zielprotein hat. XIAP ist hauptsächlich im Zytosol vorhanden. XIF1 inhibiert XIAP, indem es die Relokalisation von XIAP in den Kern fördert, sodass es im Zytosol nicht mehr zur Verfügung steht (Zusammenfassung bei Scarabelli et al., 2006). Zusammen mit oder kurz nach der Cytochrom-c-Freisetzung gelangt auch Smac aus den Mitochondrien in das Zytosol. Es bindet und inhibiert XIAP, c-IAP1, c-IAP2 und Survivin (Scarabelli et al., 2006). Omi gelangt ebenfalls mit Cytochrom-c aus den Mitochondrien in das Zytosol der Zelle und konkurriert mit Caspase 3, Caspase 7 und Caspase 9 um die Bindungsstellen von c-IAP1, c-IAP2 und XIAP (Scarabelli et al., 2006).

#### 2.2.4.2 c-FLIP

Das „**cellular Flice inhibitory protein**“ (c-FLIP) (Irmeler et al., 1997) wurde von einigen Arbeitsgruppen gleichzeitig beschrieben und hat dementsprechend mehrere Bezeichnungen: „**Inhibitor of Fas- associated death domain like interleukin- 1-  $\beta$ - converting enzyme**“ (I-Flice) (Hu et al., 1997), „**caspase homologue** (CASH) (Goltsev et al., 1997), „**caspase eight related protein**“ (Casper) (Shu et al., 1997), „**caspase like apoptosis regulator protein**“ (CLARP) (Inohara et al., 1997), „**FADD-like anti-apoptotic molecule**“ (FLAME) (Srinivasula et al., 1997), „**mach related inducer of toxicity**“ (MRIT) (Han et al., 1997) und Usurpin (Rasper et al., 1998). Das Protein hat drei endogene Formen c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub>, als lange und als kurze Form und c-FLIP<sub>R</sub> und ist bezüglich seiner Struktur Caspase-8 sehr ähnlich (Irmeler et al., 1997). Jedoch fehlen die „caspase- like“-Domäne-Reste, die für die katalytische Aktivität notwendig sind, und das caspasentypische Cystein im enzymatisch aktiven Zentrum (Scaffidi et al., 1998).

C-FLIP greift in den rezeptorvermittelten Weg der Apoptose ein, indem es auf der Ebene der Caspase 8 den weiteren Ablauf der Signalkaskade stoppt (Scaffidi et al., 1998). Zwar wird die Spaltung von Procaspase 8 in Caspase 8 von c-FLIP<sub>L</sub> gefördert, doch es kommt zu einer Bildung von Heterodimeren, die membranständig verbleiben (Micheau et al., 2002). Dies führt zu einem Abbruch des rezeptorvermittelten Apoptoseweges, da nun die aktivierte Caspase 8 nicht zum Formieren des DISC zu Verfügung steht. Bei einer sehr starken Überexpression von c-FLIP<sub>L</sub> und dessen Akkumulation im Zytoplasma finden sich auch dort solche Heterodimere, was eine weitere proteolytische Kaskade nach sich ziehen kann. Somit hat c-FLIP unter bestimmten Umständen auch eine proapoptotische Wirkung (Micheau et al., 2002).

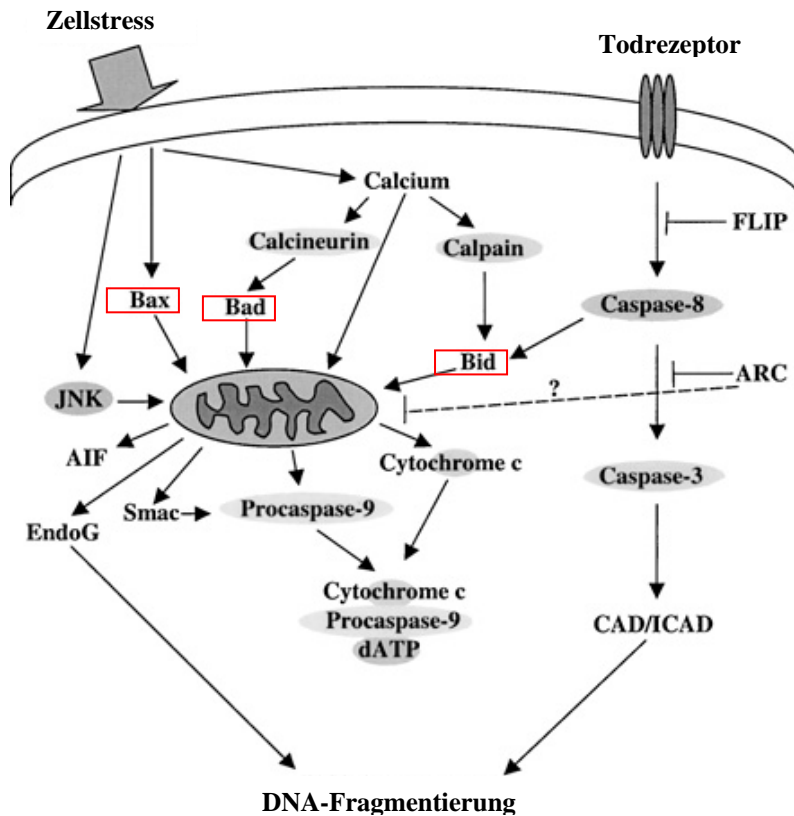
Des Weiteren spielt c-FLIP eine wesentliche Rolle bei der Induktion von NFκB, indem es mit dem „IκB Kinase“ (IKK)-Komplex an dessen γ-Untereinheit interagiert. Der Induktor ist hierbei ein Spaltprodukt von c-FLIP, das bei der Aktivierung von Procaspase 8 auftritt (P22-FLIP; Golks et al., 2006).

#### 2.2.4.3 Bcl-2-Familie

Die „B-cell-lymphoma-2“- (Bcl-2) Familie besteht aus einer antiapoptotischen Subfamilie und zwei proapoptotischen Subfamilien, wovon viele Vertreter an der äußeren Mitochondrienmembran verankert sind (Green et al., 1998; Saraste et al., 2000). Eine wesentliche Rolle beim Ablauf der Apoptose-Signalkaskade spielen die „Bcl2-like homology domain 3 (BH3)-only-proteins“ wie z. B. „**BH3 interactin death domain agonist**“ (Bid), Bim, „**Bcl-2 interacting killer**“ (Bik), „**Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter**“ (Bad), Bmf, Hrk, Puma und Noxa. Ihre Gemeinsamkeit besteht darin, dass sie alle eine proapoptotische Wirkung haben und eine sog. BH3-Domäne besitzen; ansonsten stellen sie sich jedoch strukturell sehr unterschiedlich dar (Van der Heiden et al., 1999; Häcker et al., 2005). Wie diese Proteine aktiviert werden, ist in vieler Hinsicht noch unklar. Als gesichert gilt jedoch, dass BH3-only-Proteine eine Vernetzung zwischen dem rezeptorvermittelten Weg und dem mitochondrialen Weg ermöglichen, indem z. B. Bid durch Caspase 8 gespalten und aktiviert wird und, wie die übrigen BH3-only Proteine auch, wiederum die Proteine „**Bcl-2 associated x protein**“ (Bax) und/ oder „**Bcl-2 antagonist/killer**“ (Bak) aktiviert, die zusammen mit „**Bcl-2 ovarian killer**“ (Bok) zu der zweiten proapoptotischen Bcl2-Subfamilie gehören (Adams et al., 1998).

Bax und Bak verursachen die Cytochrom-c-Freisetzung aus den Mitochondrien und leiten so den inneren Weg der Apoptose ein (Zong et al., 2001). Bax ist hierbei für die Porenbildung an

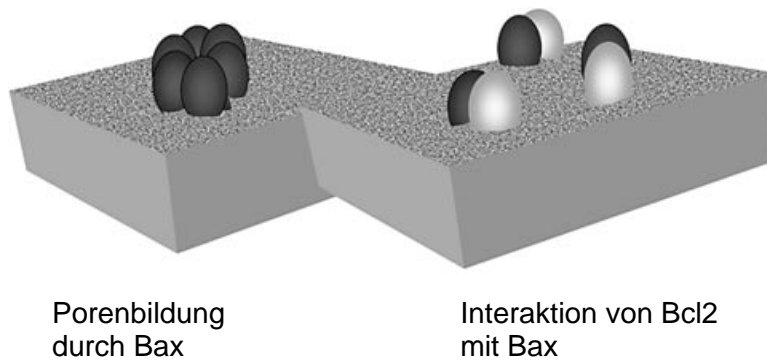
der äußeren mitochondrialen Membran verantwortlich. Die Aktivität von Bax wird dabei von Bcl-2 reguliert (Jürgensmeier et al., 1998). Bok hingegen interagiert mit seinem antiapoptotischen Familienmitglied „myeoid cell leukemia 1“ (Mcl-1) (Adams et al., 1998).



**Abbildung 5**

### **Darstellung des mitochondrialen Weges und des rezeptorvermittelten Weges der Apoptose**

Aktivierung von Bax und Bad durch zellulären Stress und dadurch Freisetzung von Cytochrom-c. Aktivierung von Bid durch Caspase 8 bei dem rezeptorvermittelten Weg. Bid aktiviert Bax und ist das Bindeglied zwischen den beiden dargestellten Wegen (modifiziert nach Gustafsson et al., 2003).

**Abbildung 6**

**Modell zur Porenbildung an der Mitochondrienmembran**  
 links: Bax aggregiert zur Porenbildung, um Cytochrom-c freizusetzen.  
 rechts: Bcl2 bildet Heterodimere mit Bax und verhindert die Porenbildung (nach Gottlieb 2001)

**Tabelle 2****Einteilung der Bcl-2- Familienmitglieder in pro- und antiapoptotische Gruppen**

<b>proapoptotisch</b>	Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Puma und Noxa (alle BH3-only Proteine); Bax, Bak und Bok
<b>antiapoptotisch</b>	Bcl-xL, Bfl-1/A1, Bcl-w, Mcl-1, Boo, NR-13, BHRF1, LMW5-HL, ORF16, KS-Bcl-2, EIB-19K

Zu der antiapoptotischen Familie gehören Bcl-2, die „long form“ der „Bcl-x isoform“ (Bcl-xL), das **Bcl-2-Homolog**, das aus der **fetalen Leber** isoliert wurde (Bfl-1/A1), Bcl-w, „**myeoid cell leukemia 1**“ (Mcl-1), Boo, NR-13, BHRF1, LMW5-HL, ORF16, KS-Bcl-2 und EIB-19K (Zong et al., 2001).

Bcl-2 kann an die aktiven Proteine Bax und Bak binden und so blocken (Häcker et al., 2005), wobei es selbst, wie auch Bcl-xL, von dem BH3-only-Protein Bad in seiner Funktion blockiert werden kann (siehe Abb. 7; Zong et al., 2001).

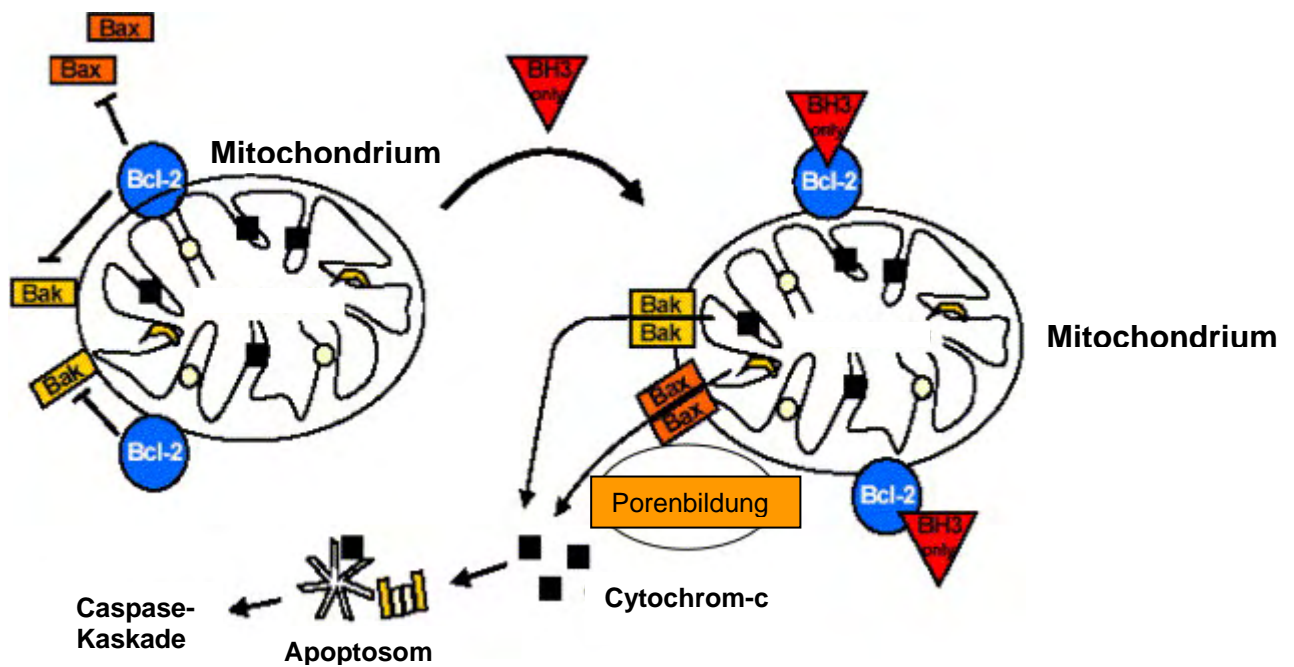


Abbildung 7

**links:** Darstellung der inhibitorischen Wirkung von Bcl-2 auf Bak und Bax.

**rechts:** BH3-only-Proteine blockieren Bcl-2; Freisetzung von Cytochrom-c, Bildung eines Apoptosoms und Aktivierung der Effektorcaspasen (modifiziert nach Scarabelli et al., 2006)

Die Aufgabe von Bcl-xL ist, die Freisetzung von Cytochrom-c und die Bindung von Caspase 9 an Apaf-1 zu verhindern und so den weiteren Ablauf des mitochondrialen Weges der Apoptose zu stoppen. Bcl-xL wiederum kann von Bik geblockt werden. dATP, das für die Stimulation von Apaf-1 verantwortlich ist, kann die inhibitorische Wirkung von Bcl-2 auf die Caspaseaktivierung auflösen, hat seinerseits aber keinen Einfluss auf den Cytochrom-c Ausstrom in das Zytosol. Sobald Caspase 3 aktiviert ist, kommt es über eine positive Rückkopplung zur Cytochrom-c-Freisetzung, welche wiederum über Bcl-2 negativ beeinflusst werden kann (Cosulich et al., 1999).

#### 2.2.4.4 Hitzeschock Proteine (HSP)

Die Mitglieder der HSP-Familie haben sowohl proapoptotische, als auch antiapoptotische Funktionen. Sie sind in der Lage, falsch gefaltete Proteine abzubauen, sie wieder neu zu falten und zu renaturieren (Saleh et al., 2000; Pandey et al., 2000). HSP27, HSP70 und HSP90 werden mit einer antiapoptotischen Wirkung beim inneren Weg der Apoptose in Zusammenhang gebracht (Zusammenfassung bei Beere, 2005). Sie können proapoptotische



Mitglieder der Bcl-2 Familie kontrollieren und so die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran verhindern. HSP70 und HSP27 wiederum können die Bid-abhängige Apoptose verhindern, sodass keine Vernetzung zwischen rezeptorabhängigem Weg und mitochondrialem Weg zustande kommt. HSP70 verhindert eine Aktivierung von Bid nicht durch Caspase-8. HSP27 blockiert die Translokalisierung von Bid. Zusammen mit HSP40 ist HSP70 in der Lage, Bax von der mitochondrialen Membran fern zu halten, damit keine Bax-vermittelten Poren in der äußeren Membran entstehen. Wenn Poren in der äußeren Mitochondrienmembran schon gebildet worden sind, kommt es neben der Cytochrom-c-Freisetzung auch zum Ausstrom des apoptosis inducing factors (AIF), der eine Rolle bei dem caspaseunabhängigen Apoptoseweg spielt. Dieser Ausstrom wird ebenfalls von HSP70 reguliert, das somit einen antiapoptotischen Effekt hat (Zusammenfassung bei Beere, 2005; Mosser et al., 2000). Die Bildung eines Apoptosoms, bei dem sich Cytochrom-c, Apaf1 und Caspase 9 zusammenschließen, kann ebenfalls von HSP70 und HSP90 gehemmt werden. Im Gegensatz dazu kann HSP70 zudem die Apoptose über den caspaseunabhängigen Weg fördern, indem es für die Integrität der lysosomalen Membran sorgt und nachfolgend kein Cathepsin ausströmen kann (Zusammenfassung bei Beere et al., 2005).

Für HSP27 wird eine Interaktion mit zytosolischem Cytochrom-c vermutet. Nach erfolgter Porenbildung an der äußeren Mitochondrienmembran wird neben Cytochrom-c und AIF ebenso Smac, das auch DIABLO genannt wird, freigesetzt. Smac inhibiert das antiapoptotische Protein XIAP. HSP27 blockiert Smac und hat so indirekt eine weitere inhibitorische Wirkung auf die Apoptose-Signalkaskade. Zusammen mit HSP27 kann HSP90 die Aktivität des BH3-only-Proteins Bad inhibieren (Zusammenfassung bei Beere, 2005).

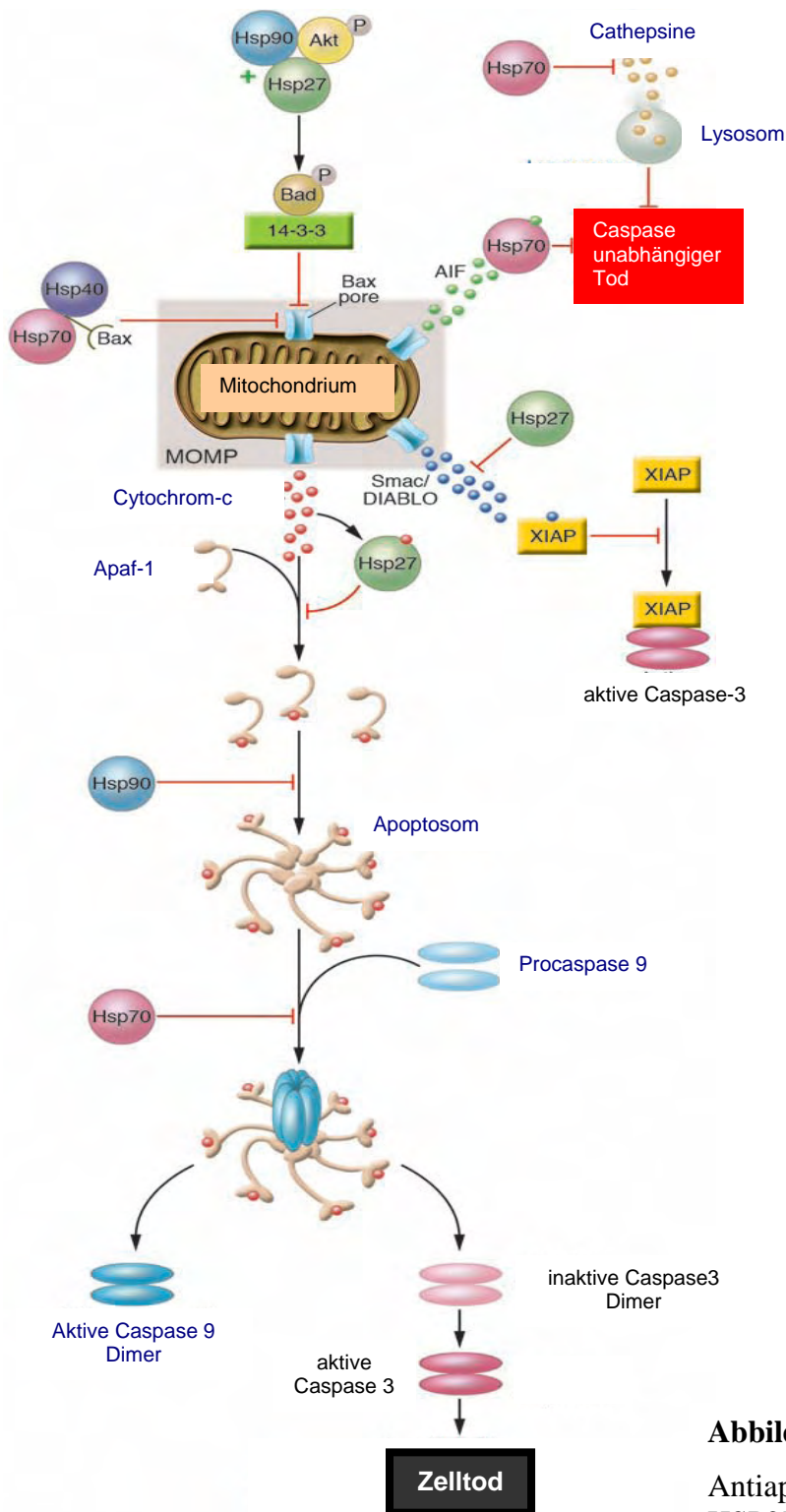


Abbildung 8

Antiapoptotische Wirkungen von HSP27, HSP40, HSP70 und HSP90 (modifiziert nach Beere, 2005)

Außerdem sind Hitzeschockproteine in der Lage, den Transkriptionsfaktor **nuclear factor kappa B** (NF- $\kappa$ B) zu beeinflussen (zu NF- $\kappa$ B siehe 3.7.5). Wenn HSP90 mit dem Koprotein Cdc37 einen Komplex bildet, bindet er an den IKK. Diese Bindung ist Voraussetzung dafür, dass eine TNF-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B stattfinden kann. HSP27 hat auch einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der NF- $\kappa$ B-Aktivität, indem es eine Proteasom-abhängige I $\kappa$ B-Phosphorylierung fördert (Zusammenfassung bei Beere, 2005).

HSP65 hat eine inhibitorische Wirkung, wenn es schon vor einem Entzündungsgeschehen bzw. vor einer Infektion exprimiert ist. Ist dies nicht der Fall, so wirkt es proapoptotisch. Solche ambivalenten Phänomene werden auch „heat shock paradoxon“ genannt (Zusammenfassung bei Beere, 2005).

**Tabelle 3**

**Übersicht über die Wirkung der Hitzeschockproteine**

<b>HSP27</b>	<b>HSP70</b>	<b>HSP70+HSP40</b>	<b>HSP90</b>	<b>HSP90+HSP27</b>
Blocken von Bid	Blocken von Bid	Blocken von Bax	indirekte Aktivierung von NF- $\kappa$ B	Inhibition von Bad
Blocken von Smac	Hemmung des AIF-Ausstroms		Inhibition der Bildung eines Apoptosoms	
Interaktion mit Cytochrom-c	Erhaltung der lysosomalen Membran			
	Inhibition der Bildung eines Apoptosoms			
	Hemmung des Cytochrom-c-Ausstroms			

#### 2.2.4.5 Poly-ADP-ribose-polymerase (PARP)

PARP ist ein kernständiges Enzym, das an DNA-Strangbrüche bindet und damit enzymatisch aktiv wird. Es wird von Caspasen in zwei Fragmente spezifisch gespalten (D'Amours et al., 1998) und spielt sowohl bei der Reparatur von DNA-Strangbrüchen eine Rolle (Durkacz et al., 1980; Whish et al., 1980) als auch bei der Apoptose. Bei exzessiven DNA-Schäden kommt es zu einer erhöhten Aktivität dieses Proteins (Jacobsen et al., 1999).

#### 2.2.4.6 p53

P53 gehört zu den Tumor-Suppressor-Proteinen und ist bei der Einleitung des mitochondrialen Weges der Apoptose wesentlich beteiligt.

Treten DNA-Schäden oder zellulärer Stress auf, so wird p53 stimuliert, gelangt aus dem Kern in das Zytosol und rekrutiert Bax aus der Bcl-2-Familie an die mitochondriale Membran, sodass eine Cytochrom-c-Ausschüttung eingeleitet werden kann (Vousden et al., 2000; siehe Abb. 2). Zytosolisches p53 wird von Bcl-xL konfisziert und so in seiner Aufgabe behindert, hingegen fördert nukleäres p53, das bei Schädigung der DNA verstärkt auftritt, die Expression von Puma, einem der BH3-only Proteine, das in der Lage ist, die hemmende Wirkung von Bcl-xL auf p53 aufzuheben (Chipuk et al., 2005).

#### 2.2.4.7 NFκB und IκB

Für die transkriptionelle Regulation vieler Inhibitorproteine ist der Transkriptionsfaktor „nuclear factor **kappa B**“ (NF-κB) verantwortlich (Barkett et al., 1999). NF-κB wird durch eine Reihe intrazellulärer und extrazellulärer Stimuli induziert. Im nicht stimulierten Zustand ist NF-κB an seinen Inhibitor IκB als IκB-Kinase-Komplex (IKK) im Zytoplasma gebunden. Kommt es zu einem entsprechenden Signal werden der IKK aktiviert, IκB phosphoryliert und NF-κB entsprechend freigesetzt. Letzteres gelangt in den Kern und kann hier seine Funktion ausüben (Karin et al., 2000). In letzter Zeit mehren sich allerdings die Hinweise, dass NF-κB nicht nur für das Hochregulieren von antiapoptotischen Proteinen verantwortlich ist, sondern auch bei der Förderung der Apoptose eine Rolle spielt. So haben z. B. Poppelmann et al. (2005) im Zusammenhang mit einer Apoptoseinduktion durch UV Strahlen eine Aktivierung von NFκB nachgewiesen, die die Transkription von antiapoptotischen Genen, wie zum Beispiel von c-IAP und FLIP unterdrückte. Parallel dazu wurde jedoch TNF-α freigesetzt, was zu einer Aktivierung des rezeptorvermittelten Weges der Apoptose führte.

### 2.3 Modulation der Apoptose durch intrazelluläre Parasiten

Bei intrazellulären Protozoen ist von einigen Vertretern unterschiedlicher Stämme bekannt, dass sie sehr spezifisch in die Apoptosefähigkeit ihrer Wirtszelle eingreifen können. Zum Unterstamm der Apikomplexa und zur Klasse der Coccidida zählen hierbei die Gattungen *Eimeria*, *Toxoplasma* und *Cryptosporidium*, zu der Klasse der Haematozoa *Plasmodium* und zu der Klasse der Piroplasmen *Theileria*. Auch in anderen Stämmen wie Euglenozoa mit dem

Unterstamm Kinetoplasta finden sich in diesem Sinne aktive Organismen, so z. B. *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania spp.*. Solche Einflüsse sind auch aus dem Stamm der Microspora für die Gattung *Nosema* bekannt.

### 2.3.1 Eimeria tenella und Eimeria necatrix

Die mit *E. bovis* nah verwandten Arten *E. tenella* und *E. necatrix* können bei Hühnervögeln zu schweren Diarrhoen mit hoher Morbidität und Mortalität führen. *E. tenella* verursacht eine hämorrhagische Blinddarmcoccidiose, *E. necatrix* hingegen befällt den Dünndarm. Ein subklinischer Verlauf führt zu Gewichtsverlust, verminderter Legeleistung und verminderter Gewichtszunahme (Eckert et al., 2004). Diese Eimerien sind in der Lage, die Wirtszelle vor der Apoptose zu schützen.

Für diese Protozoen konnte gezeigt werden, dass sie über eine Modulation der Wirtszelle diese vor Apoptose schützen können. Um das Überleben in der Wirtszelle zu sichern, bedienen sich die Schizonten der zweiten Generation dieser Parasiten der Hochregulation der Expression des Inhibitors Bcl-xL, der die Freisetzung von Cytochrom-c und die Bindung von Caspase 9 an APAF-1 verhindert und somit auf den Fortlauf des mitochondrialen Weges einen negativen Einfluss hat (Del Cacho et al., 2004).

Ebenso findet man in infizierten Zellen ein erhöhtes Maß von I $\kappa$ B in phosphorylierter Form vor, welches notwendig ist, um NF $\kappa$ B aus seinem inaktiven Komplex mit I $\kappa$ B zu befreien, sodass es aus dem Zytosol in den Kern treten kann.

In infizierten Zellen wurde eine erhöhte Konzentration kernständigen NF $\kappa$ Bs in der Wirtszelle nachgewiesen, das in der Folge an DNA bindet und unter anderem die Transkription der entsprechenden Proteinsequenz von Apoptoseinhibitoren hochregulieren kann (Del Cacho et al., 2004).

### 2.3.2 Toxoplasma gondii

*T. gondii* ist ein obligat intrazelluläres Protozoon, das die Katze als Endwirt hat. Zahlreiche Säugetiere und auch Vögel können als Zwischenwirt dienen. Es ist Erreger einer Zoonose, wobei bei einer Erstinfektion schwangerer Frauen erhebliche Schäden der Frucht auftreten können (Wilson et al., 1980).

Göbel et al. konnten bereits 1999 mit Hilfe des TUNEL-Assays die Inhibition der Apoptose *T. gondii*-infizierter Zellen nachweisen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass *T. gondii* infizierte Zellen sowohl gegen die Granzym B-induzierte Apoptose, als auch gegenüber dem

rezeptorvermittelten Weg der Apoptose resistent sind (Nash et al., 1998). Initiator- und Effektorcaspasen werden durch die Infektion beeinträchtigt (Carmen et al., 2006).

Die Besonderheit bei einer Infektion mit *T. gondii* ist, dass nicht nur infizierte Zellen, sondern auch nicht infizierte Zellen beeinflusst werden. So kommt es *in vitro* in nicht-infizierten Zellen zu einer erhöhten und in infizierten Zellen desselben Zellrasens zu einer verringerten Apoptoserate (Hu et al., 1999). Sowohl in infizierten, als auch nicht infizierten Zellen wird Fas und der FasL hochreguliert, sodass es zu einem programmierten Zelltod über den rezeptorvermittelten Weg kommen kann (Hu et al., 1999; Liesenfeld et al., 1997). Davon sind auch CD4<sup>+</sup>-Zellen betroffen, was zur Folge hat, dass stark entzündliche Reaktionen im Körper ausbleiben. Die Immunantwort auf eine *T. gondii*-Infektion ist somit eingeschränkt. *T. gondii* schützt sich vor der Apoptose in der infizierten Zelle durch eine bemerkenswerten Erhöhung der mRNA der antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern Bcl-2, Bfl-1, Bcl-xL und Bclw. Hingegen findet man kaum eine Veränderung in der mRNA-Konzentration von BH3-only-Proteinen Bad, Bid, Bik und Bim und sowie der von den proapoptotischen Proteinen Bax, Bak und Bok (Molestina et al., 2003). Für weitere antiapoptotische Bcl-2-Proteinfamilienmitglieder Mcl-1 und Bfl-1/A1 konnte ebenfalls ein erhöhter Spiegel in *T. gondii*-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Lüder et al., 2005; Göbel et al., 2001; Molestina et al., 2003). Die proapoptotischen Proteine Bax und Bad zeigen hier einen verringerten Spiegel, wodurch es zu einer verminderten Cytochrom-c-Freisetzung kam (Lüder et al., 2005). Des Weiteren zeigten infizierte Zellen einen erniedrigten PARP-Spiegel und wie schon erwähnt, einen erhöhten Mcl-1 Proteinspiegel, wobei PARP, wie oben beschrieben, bezüglich der Apoptose ambivalent erscheint und dessen Rolle hierbei noch nicht ganz geklärt ist (Göbel et al., 2001).

*T. gondii* ist zudem nach Molestina et al. (2003) in der Lage, NF-κB zu aktivieren und es für seine Zwecke zu nutzen. In infizierten Zellen kommt es so zu einer schnellen Akkumulation von NF-κB im Zellkern.

Insgesamt kommt es in *T. gondii*-infizierten Zellen deutlich zu einer Abnahme der Caspase 3-, Caspase 7- und Caspase 9-Aktivität (Keller et al., 2006). Es konnte noch kein eindeutiger Beweis dafür erbracht werden, dass auch Caspase 8 unter der Kontrolle des Parasiten steht.

### 2.3.3 *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidien sind Sporozoa der Unterordnung Eimeriina und etablieren sich im Gegensatz zu anderen Vertretern der Unterordnung zwar intrazellulär aber extrazytoplasmatisch. Nach der Ingestion und der Excystierung der Oozysten dringt der Sporozoit an der apikalen

Membran der Wirtszelle ein und wird daraufhin von der Wirtszelle eingehüllt. Es schließt sich eine Membranfusion an der Basis des Protozoons an und die Wirtsmembran löst sich an dieser Stelle auf. Die parasitäre Membran erweitert sich, sodass sie an dieser Stelle direkten Kontakt zum Cytoplasma hat (Marcial et al., 1986; Hamer et al., 1993). Cryptosporidien spielen in der Veterinärmedizin mit *C. parvum* hauptsächlich beim Kalb eine Rolle. Bestimmte Genotypen des Erregers verursachen beim immungeschwächten Menschen, insbesondere AIDS-Patienten, eine bisweilen tödlich verlaufende Infektion (Santin et al., 2004; Chen et al., 1999).

Bezüglich der Apoptoseinduktion oder –hemmung bei *C. parvum*-infizierten Zellen, liegen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse vor. *In vitro* zieht eine *C. parvum*-Infektion eine Apoptose in intestinalen und biliären Epithelzellen nach sich (Chen et al., 1999; O'hara et al., 2006). Dabei findet sich *in vitro* in *C. parvum*-infizierten Epithelzellen und in nicht infizierten Nachbarzellen eine erhöhte Konzentration von Fas- und FasL-Molekülen an der Zellmembran. Die dadurch eingeleitete Apoptose kann durch Caspaseinhibitoren und Fas/FasL-neutralisierende Antikörper geblockt werden. Werden nicht infizierte Epithelzellen oder Fas-sensitive Jurkat Zellen zusammen mit *C. parvum*-infizierten Zellen co-kultiviert, so kommt es in beiden Zellen zur Expression von Fas und FasL (Chen et al., 1999). *In vivo* dagegen wurde eine vermehrte Apoptoseaktivität nur in benachbarten Zellen der *C. parvum*-infizierten Zellen gefunden (Chen et al., 2001). *In vitro* wiederum zeigen *C. parvum*-infizierte intestinale Epithelzellen auch einen Schutz vor dem programmierten Zelltod, wenn Apoptoseinduktoren eingesetzt wurden. Hierbei kam es zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B in infizierten Zellen (Mc Cole et al., 2000; Chen et al., 2001). Chen et al. (2001) fanden in infizierten biliären Epithelzellen einen Abbau von I $\kappa$ B und eine nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B. In Nachbarzellen wurde dieses Phänomen nicht beobachtet (Chen et al., 2001).

#### 2.3.4 *Plasmodium spp.*

*Plasmodium* spp. sind Erreger, bei denen im Vertebraten ausschließlich die asexuellen Vermehrungsschritte stattfinden; die Gamogonie mit der Entwicklung zum Sporozoiten erfolgt in Mücken. Beim Menschen verursachen diese Parasiten die Malaria mit hoher Morbidität und, erregerabhängig, hoher Mortalität. Die Entwicklung bei Vertebraten schließt eine erste Merogonie in Leberzellen ein, während der in einem artabhängig 6 bis 16-tägigen Prozess Merozoiten entstehen, die nun Erythrozyten befallen und dann dort wieder artabhängig in relativ kurzen Zeiträumen von 48-72 h zum nächsten Merozoitenstadium proliferieren. Der letztere Prozess wiederholt sich anhaltend und wird bei einigen Arten allerdings durch eine sich ausbildende Immunität des Wirtes gebremst (Kayser et al., 1998).

Mehrere Untersuchungen aus den letzten Jahren lassen den Schluss zu, dass antiapoptotische Mechanismen, ausgelöst durch den Parasiten, die Voraussetzung dafür schaffen, dass Plasmodien ihre langandauernde erste Merogonie durchführen können. Studien von Doolan und Hoffmann (2000) zeigen z. B., dass spezifisch gegen den Parasiten gerichtete, zytotoxische T-Zellen, auch über eine Interferon- $\gamma$  oder NO-Produktion die mit *Plasmodium* spp. infizierten Zellen nicht beseitigen können. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass der Parasit in den Fas und/ oder Granzym B vermittelten Apoptoseweg eingreifen kann und somit seine Replikation sichert.

Auf dem Weg der Sporozoiten durch die Leber bis zur adäquaten Zielzelle werden relativ viele Zellen zerstört, was dazu führt, dass der „hepatocyte growth factor“ (HGF) freigesetzt wird, der unter anderem wichtig für die Etablierung von *Plasmodium* spp. in der Leber ist (Carrolo et al., 2003). Es ist bekannt, dass Signale, die über den Rezeptor für HGF, „c-met“ laufen, die Apoptose in Hepatozyten inhibieren (Hu et al., 2004). Das HGF-Rezeptor-vermittelte Signal in infizierten Zellen dauert nur einige Stunden an. Dennoch sind Wirtszellen 1-2 Tage p.i. vor einem Zelltod durch Serumentzug und Peroxidasen geschützt. Diese Resistenz wird jedoch nicht durch HGF vermittelt, da das Blockieren dieses Signals keinen Einfluss mehr auf die Lebensfähigkeit der Zelle hat. Die Beobachtung, dass solche Zellen gegen TNF- $\alpha$ - und D-Galaktosamin-induzierte Apoptose gefeit sind, lässt den Schluss zu, dass *Plasmodium* spp. direkt mit dem Netzwerk der Apoptoseregulation interagieren (van de Sand et al., 2005). So weist die Wirtszelle z. B. eine Überexpression von Glutamylcystein-Synthase auf, die auf die TNF- $\alpha$ -vermittelte Apoptose einen hemmenden Einfluss hat und die NF- $\kappa$ B-Aktivität reguliert (Manna et al., 1999). Leberzellen von Mäusen, die mit *Plasmodium* spp. infiziert sind, zeigen einen Schutz vor TNF- $\alpha$ -induzierter Apoptose. Dieser Schutzmechanismus scheint jedoch mit der Lebensfähigkeit des Parasiten verknüpft zu sein,



da infizierte Zellen mit abgestorbenen Parasiten eine Infiltration von immunkompetenten Zellen verursachen. Dies impliziert, dass diese Wirtszellen nicht mehr vor dem programmierten Zelltod geschützt sind (van de Sand et al., 2005) und somit von den Zellen des Immunsystems erkannt werden.

#### 2.3.5 *Theileria parvum*

*Theileria parvum* wird von Zecken auf eine Reihe von Ruminanten übertragen und ist der Erreger des Ostküstenfiebers mit einer Mortalitätsrate von fast 100%. Symptome dieser Erkrankung sind Lymphknotenschwellung, Fieber, Dyspnoe, blutig, schleimiger Durchfall und ZNS-Störungen (Eckert et al., 2004). Durch einen rezeptorvermittelten Mechanismus gelangt der Parasit in mononukleäre Leukozyten (Lymphozyten, Makrophagen), die seine Zielzellen darstellen (Shaw et al., 1997). *T. parvum* liegt im Cytoplasma frei vor und entwickelt sich dort zum Schizonten. Dieses Stadium verursacht eine unkontrollierte Proliferation der Wirtszelle, was in eine klonale Expansion infizierter Zellen mündet, wobei sich auch der Parasit bei der Mitose teilt. In der Wirtszelle wird permanent I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  unterdrückt, sodass NF- $\kappa$ B in aktiver Form vorliegt (Palmer et al., 1997). Wie bei *Cryptosporidium* spp. Beschrieben, führt eine Unterdrückung von NF- $\kappa$ B zur Apoptose der Wirtszelle.

Obwohl infizierte Zellen mit einer vermehrten Bildung der proapoptotischen Faktoren APAF1, Fas und FasL reagieren, sterben sie nicht. Hier liegt offensichtlich eine parasitvermittelte Gegenregulation vor, bei der der rezeptorvermittelte Weg durch den Inhibitor c-FLIP gestoppt wird und zudem die Effektorcaspasen über vermehrte Expression von cIAP und XIAP in ihrer Aktivität gehemmt werden (Künzi et al., 2003). Werden solche Zellen mit dem Theileriazid BW720c behandelt, sinken die Konzentrationen von c-FLIP und XIAP innerhalb von drei Tagen unter die Nachweisgrenze, was wiederum für die Notwendigkeit der Lebensfähigkeit des Parasiten spricht und zudem eine kurze Halbwertszeit der Proteine vermuten lässt (Künzi et al., 2003).

Hingegen bleiben Fas und FasL nach der Eliminierung von *T. parvum* mindestens drei Tage konstant exprimiert, was sogleich mit dem Auftreten von aktiven Caspasen einher geht. Dagegen sind Bcl-2 und Bcl-xL als auch deren proapoptotischer Gegenspieler Bax gleichbleibend in infizierten und behandelten Zellen vorhanden. Daraus lässt sich schließen, dass der innere Weg bei ehemals infizierten Zellen kaum eine Rolle bei der nachfolgenden Apoptose spielt (Künzi et al., 2003).

### 2.3.6 *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* ist der Erreger der Chagas-Krankheit, die bei Menschen und zahlreichen Wirbeltieren in Mittel- und Südamerika vorkommt und durch den Kot der Raubwanze übertragen wird. Es handelt sich um einen intrazellulären Parasiten, der vor allem glatte und quergestreifte Muskelzellen, sowie Herzmuskelzellen befällt. Einige Einzeller dringen auch in die Neuroglia ein. Die akute Phase der Infektion verläuft beim Menschen weitgehend unauffällig. Nach 10-20 Jahren treten aufgrund des geschädigten Gewebes Symptome wie Megacolon, Megaösophagus, Megacor und neurologische Störungen auf. Bei infizierten Hundewelpen treten akutes Fieber, Anämie, Kachexie, Ödembildung und Herzinsuffizienz auf.

*T. brucei gambiense* und *brucei rhodesiense* sind die Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit und werden durch den Stich der Tsetse-Fliege übertragen. *T. brucei brucei*, *T. congolense*, *T. suis*, *T. simiae* und *T. vivax* werden ebenfalls vorwiegend durch die Tsetse-Fliege übertragen und verursachen die Nagana-Seuche. *T. brucei evansi* löst in Nord- und Ostafrika sowie in Asien die Surra aus und *T. brucei equinum* in Südamerika die Mal de Caderas. Weltweit spielt für die Equiden die Beschälseuche, die durch *T. brucei equiperdum* übertragen wird, als Kontaktinfektion eine Rolle (Eckert et al., 2004)

*T. cruzi* durchläuft zwei wesentliche Entwicklungsstadien in seinem vertebraten Wirt. Infektiöse Trypomastigoten zirkulieren zunächst extrazellulär im Blutstrom und befallen verschiedene Wirtszellen, wie Makrophagen, Herzmuskelzellen und Gliazellen. Sind sie im Cytoplasma angelangt, transformieren sie sich zu amastigoten Formen und nach einigen Teilungen wieder zu Trypomastigoten, die dann in den Blutstrom entlassen werden.

Die ersten Hinweise darauf, dass während der intrazellulären Phase die Apoptose der Wirtszelle inhibiert wird, zeigten sich in der Beobachtung, dass infizierte Fibroblasten bis zur Freisetzung der Parasiten nicht sterben (Clark et al., 1999). Bei infizierten Hela-Zellen wurde das gleiche nachgewiesen, wobei die Fas-vermittelte Apoptose reduziert und sowohl die Caspase 3- als auch die Caspase 8-Aktivität und die DNA-Fragmentation vermindert waren. Von *T. cruzi* wird eine trans-Sialidase produziert, welche das Neuritenwachstum induziert und neuronale Zellen vor dem programmierten Zelltod bei Wachstumsfaktorenentzug schützt. Des Weiteren wird durch dieses Enzym das antiapoptotische Protein Bcl-2 in der Zelle hochreguliert, was wiederum mit dem Überleben der Zelle korreliert (Chuenkova et al., 2000).

Die Infektion humaner Epithelzellen mit *T. cruzi* ist zudem mit einer erhöhten NF-κB Aktivität assoziiert (Huang et al., 1999). Dies konnte auch Petersen (2006) bei kardialen Zellen in Kombination mit einer erniedrigten Caspase 3-Aktivität nachweisen. Kontrovers

dazu verglich Hall (2000) Infektionsraten in Herzmuskel- und Endothelzellen und fand eine Korrelation zwischen parasitär-induzierter Aktivierung von NFκB und Infektionsresistenz. In relativ resistenten Endothelzellen führt die Infektion zu einer starken Aktivierung von NFκB. Empfindliche Myozyten hingegen zeigen keine Aktivierung von NFκB durch den Parasiten. Dies lässt vermuten, dass NFκB eher die Infektion inhibiert, als dass es verantwortlich für eine Apoptoseinhibition ist.

### 2.3.7 *Leishmania spp.*

Generell lässt sich die Leishmaniose in drei Gruppen untergliedern, die viszerale, die kutane und die mukokutane Leishmaniose. Die Leishmaniose des Hundes ist der viszeralen Form zuzuordnen, wobei es bei den meisten erkrankten Hunden auch zu kutanen Veränderungen kommt. Die Symptome dieser Erkrankung sind generalisierte Lymphknotenschwellung, Hautläsionen ohne Juckreiz, Fieber, Diarrhoe, Inappetenz, Apathie, Lahmheiten, Milz- und Lebervergrößerung, Niereninsuffizienz, Keratokonjunktivitis, Hyperalbuminämie, Anämie, und Hyperglobulinämie. Diese Symptome sind auch auf die viszerale Form der humanen Leishmaniose zu übertragen. Die kutane Leishmaniose des Menschen wird auch als Orientbeule bezeichnet. Hierbei entwickeln sich multiple, trockene, später geschwürig zerfallende Papeln. Die Schleimhautleishmaniose ist der Orientbeule sehr ähnlich, jedoch hat sie eine Tendenz zur Ausbreitung in Schleimhäuten und führt zu einer starken Gewebszerstörung (Eckert et al, 2004).

Die promastigote Form von *Leishmania spp.* wird durch die Schmetterlingsmücke auf einen vertebraten Wirt durch den Stechakt übertragen und befällt dann Makrophagen, in denen eine ungeschlechtliche Vermehrung stattfindet, worauf die Zelle zerstört wird und die freigewordenen Parasiten neue Zielzellen aufsuchen. Amastigote Formen werden von den Mücken beim Stechakt mit den Wirtszellen wieder aufgenommen, und entwickeln sich in deren Darm zu promastigoten Formen, die in die Speicheldrüse wandern und so wieder übertragen werden können.

Moore et al. (1994) infizierten Makrophagen, die aus dem Knochenmark gewonnen worden waren mit *L. donovani*-Promastigoten. Weitere Makrophagen behandelte er mit Lipophosphoglykan (LPG), dem hauptsächlichen Oberflächenmolekül der Promastigoten. In beiden Fällen kam es zur Inhibition einer durch den Entzug von Makrophagen-Wachstumsfaktor (M-CSF) induzierten Apoptose. Dieser Effekt wurde auch beobachtet, wenn man Zellen mit dem Überstand von infizierten Makrophagen behandelte, was auf einen löslichen Faktor hinweist, der von infizierten Zellen abgegeben wird. Neutrophile

Granulozyten haben im peripheren Blut eine Halbwertszeit von 6-10 Stunden, eine Infektion dieser Zellen mit Leishmanien verschiebt den programmierten Zelltod bis zu 24 Stunden, wobei man eine deutlich reduzierte Aktivität von Caspase 3 beobachten kann (Aga et al., 2002). Allerdings sind dazu vitale Parasiten notwendig, da Zellen, die mit einem Lysat aus *L. major* oder mit toten Parasiten behandelt wurden, diesen Effekt nicht aufweisen. Eine Behandlung von nicht infizierten neutrophilen Granulozyten mit dem Überstand von infizierten neutrophilen Granulozyten kann die Apoptose ebenfalls nicht verzögern (Aga et al., 2003).

Ähnliche Versuche wurden von Lisi et al. (2005) mit der humanen Monozytenzelllinie U-937 durchgeführt. Diese Zellen wurden mit *L. infantum* infiziert oder mit aufgereinigtem LPG oder mit dem parasitenfreien Überstand von *L. infantum* behandelt. Anschließend wurde versucht eine Apoptose mit Actinomycin D zu induzieren, wobei in allen drei Fällen eine Apoptoseinhibition und eine verminderten Caspase 3-Aktivität nachgewiesen wurden.

#### 2.3.8 *Nosema algerae*

Dieser Parasit, der humane Lungenfibroblasten invadiert, ist ebenso in der Lage sein Überleben durch die Inhibition der Wirtszellapoptose zu sichern. Infizierte Zellen erweisen sich im Gegensatz zu nicht infizierten als resistent gegenüber einer TNF/ Cycloheximidin-Behandlung, welche normalerweise die Apoptose induziert. Hierbei konnte ein erhöhter Spiegel von Bcl-2 und ein verminderter Spiegel von Bax nachgewiesen werden, was auf eine parasiten-induzierte Beeinflussung des mitochondrialen Weges der Apoptose schließen lässt (Scanlon et al., 1999).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Apikomplexa einen stark antiapoptotischen Einfluss auf ihre Wirtszelle haben können und sich dabei offensichtlich unterschiedlicher Mechanismen bedienen. Bei allen oben beschriebenen Protozoen konnte in infizierten Zellen eindeutig eine Hemmung des programmierten Zelltodes nachgewiesen werden. In vielen Fällen wurde dies über eine Aktivierung von NFκB festgestellt (*E. tenella*, *E. necatrix*, *T. gondii*, *C. parvum*, *Plasmodium*, *T. parvum*, *T. cruzi*, *N. algerae*). Auch die Beeinflussung der Mitglieder der Bcl-2-Familie bei *E. tenella*, *E. necatrix*, *T. gondii*, *T. cruzi* und *N. algerae* scheint ein wirkungsvoller Mechanismus zu sein. *T. parvum* hingegen nutzt für sich die Inhibitoren c-FLIP, XIAP und c-IAP. Auch wenn durch die Infektion durch *T. gondii*, *C. parvum* und *T. parvum* proapoptotische Faktoren wie Fas und FasL hochreguliert werden,

sind die gegenregulatorischen Maßnahmen des Parasiten effektiv genug, um eine Apoptose der Wirtszelle zu verhindern.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Parasit *Eimeria bovis*

Bei dem verwendeten Stamm von *Eimeria bovis* handelte es sich um ein vor 16 Jahren gewonnenes Feldisolat aus Norddeutschland (Fliege et al., 1992). Um diesen Stamm H zu erhalten, musste in regelmäßigen Abständen eine experimentelle Infektion von Kälbern durchgeführt werden, damit frische Oozysten gewonnen werden konnten.

#### 3.2 Versuchstiere

##### 3.2.1 Kälber

Als Versuchstiere wurden Bullenkälber eingesetzt, die im Alter von 2 Wochen von ortsansässigen Landwirten aufgekauft wurden. Dabei handelte es sich um die Rasse Deutsch Schwarzbunt.

Da eine kokzidienfreie Aufzucht der Kälber essentiell war, wurden diese im institutseigenen Stall in gekachelten Räumlichkeiten, die nur über eine Desinfektionsschleuse zu erreichen waren, aufgezogen. Die Kälber wurden klinisch parasitologisch, virologisch und bakteriologisch untersucht. Jedes Tier erhielt zusätzlich prophylaktisch Toltrazuril p.o. (20 mg/kg KGW) und 1% Flumethrin (1 ml/kg KGW) als pour on. Die Aufzucht erfolgte in Edelstahlstoffwechselkäfigen.

Zunächst erhielten die Kälber zweimal täglich Milchaustauscher (200 g/ Mahlzeit, RCG, Münster) und ab der vierten Lebenswoche zusätzlich pelletiertes Kraftfutter (Raiffeisen Warenzentrale Rhein Main eG Werk, Wiesbaden) zur freien Aufnahme. Des Weiteren standen autoklaviertes Heu und Wasser ad libitum zur Verfügung.

##### 3.2.2 Infektion von Kälbern mit *Eimeria bovis*- Oozysten

Material:

- ❖ Oozystensuspension in 2 %  $K_2Cr_2O_7$  (Lagerung bei 4 °C)
- ❖ Phosphate buffered saline (PBS) Zubereitung aus einer 10 fachen Stammlösung
- ❖ 10 x PBS

137 mM NaCl, 80 g/l (Roth)

2.7 mM KCl, 2 g/l (Merck)

1.5 mM  $KH_2PO_4$ , 2 g/l (Merck)

6.5 mM  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , 11.5 g/l (Merck)

#### Durchführung:

Im Alter von 7 Wochen wurden die Kälber mit je 50.000 sporulierten *E.bovis*-Oozysten oral infiziert. Um die entsprechende Menge der Oozystensuspension von  $\text{Kr}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  zu reinigen (siehe 3.2.3.), wurde diese bei 400 x g 10 min zentrifugiert, wobei das gewonnene Pellet 3 x mit PBS gewaschen wurde. Das in 10 ml PBS suspendierte Pellet wurde jeweils einem Versuchstier oral appliziert.

Ab dem 18. Tag p.i. wurden die gewonnenen Kotproben täglich untersucht, und die Oozystenmenge wurde anhand des sog. OPG- Wertes (Oozystenmenge pro Gramm Kot) ermittelt.

#### 3.2.3 Gewinnung und Sporulation der *Eimeria bovis*- Oozysten

##### Material:

- ❖ verschiedene Siebe mit der Maschengröße 300  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$  und 80  $\mu\text{m}$
- ❖ Gesättigte Zuckerlösung mit einer spezifischen Dichte von 1.35g/ml
- ❖ Aärometer (IDL) mit einem Messbereich von 1- 1.2 und 1.2- 1.4g/ml
- ❖ Flache, rechteckige Plastikschrallen und dazu passende Glasplatten
- ❖ 10 l Plastikeimer
- ❖ ZentrifugengefäÙe 250 ml aus Polypropylen (Herolab Longlife®)
- ❖  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ - Lösung (Merck) 2 % und 4 %
- ❖ Zellkulturflaschen, Nunc Easy Flasc TM (Nunc) 75  $\text{cm}^2$

#### Durchführung:

Ab dem 18. Tag p.i. wurde der Kälberkot gesammelt und der OPG-Wert bestimmt. Sobald der Wert 100 erreichte, wurde der Kot mit Leitungswasser versetzt und durch die Siebe in absteigender Maschenweite gewaschen. Hierdurch wurden grobe Partikel aus der Suspension entfernt. Anschließend ruhte die Suspension zur Sedimentation der Oozysten in 10 l Eimern über zwei Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde ca. die Hälfte des Kotwassers abgekippt, das Sediment mit der angefertigten Zuckerlösung versetzt und auf eine Dichte von 1.15 g/ml eingestellt.

Plastikwannen wurden bis zum Rand mit dieser Mischung befüllt und Glasplatten darauf geschoben. Nach zwei Stunden konnten die Platten abgehoben und die an den Glasplatten haftenden Oozysten mit Wasser abgewaschen werden.

Die gewonnen Oozysten wurden bei 400 x g 10 min zentrifugiert und das Sediment mit Aqua dest. gewaschen. Daraufhin wurden die Oozysten 1:1 mit 4 %  $K_2Cr_2O_7$  versetzt, sodass eine 2 % Suspension entstand, die in flache Schalen gefüllt wurde.

Die Sporulation erfolgte innerhalb einer Woche in den Schalen, wobei die Suspension mittels einer Pipette regelmäßig mit Sauerstoff begast wurde.

Danach wurden die sporulierten Oozysten abzentrifugiert (400 x g, 10 min), in einer 2 %igen  $K_2Cr_2O_7$ -Lösung suspendiert und in Zellkulturflaschen bei 4 °C aufbewahrt. Um einen Zutritt von Sauerstoff zu sichern, durften die Flaschen nicht dicht verschlossen werden.

### 3.2.4 Gewinnung von *Eimeria bovis*- Sporozoiten

Material:

- ❖ Oozystensuspension in 2 %iger  $K_2Cr_2O_7$ -Lösung
- ❖ Percoll<sup>TM</sup> (Amersham Bioscience)
- ❖ 1,5 M NaCl (Roth)
- ❖ 0,15 M NaCl (Roth)
- ❖ frisch hergestellte Natriumhypochloridlösung mit 4 % wirksamem Chlor (Roth)
- ❖ Inkubationsmedium, frisch hergestellt und steril filtriert; 0,35 % L- Cystein HCL (Serva), 1,68 % Natriumhydrocarbonat,  $NaHCO_3$  (Merck)
- ❖ Excystiermedium, steril filtriert und auf 37 °C angewärmt
  - 0,12 g Trypsin 1:250 (Sigma)
  - 2,4 ml Rindergalle
  - 2,76 ml 1 x HBSS (Hank's balanced salt solution), frisch hergestellt

Durchführung:

Zunächst mussten die Oozysten mittels isopyknischer Zentrifugation mit Percoll-Gradienten aufgereinigt werden. Dazu wurde eine isotonische Stammlösung (IPS) benötigt, die aus neun Teilen (v/v) Percoll und einem Teil (v/v) 1.5 M NaCl bestand.

Um eine 60 %ige Percoll-Lösung herzustellen, wurden sechs Teile IPS und vier Teile (v/v) NaCl gemischt. Zur Herstellung einer 50 % Percoll-Lösung benötigte man fünf Teile IPS und fünf Teile (v/v) NaCl.

Je 10 ml der Percoll-Lösungen wurden 20min bei 4°C und 30.000 x g zentrifugiert, so dass sich Dichtegradienten aufbauten. Die Oozystensuspension wurde 10 min bei 400 x g



zentrifugiert, das entstandene Pellet mit Natriumhypochlorid aufgenommen und im Eisbad 2 min unter konstantem Rühren inkubiert.

Danach wurden die Oozysten 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Der oozystenhaltige Überstand wurde 1:1 mit Wasser gemischt. Zur erneuten Sedimentation wurden die Oozysten abermals 10 min bei 400 x g zentrifugiert. Das mit Wasser resuspendierte Sediment wurde vorsichtig auf den 60 %igen Percoll-Gradienten aufgetragen und anschließend 20 min bei 400 x g in einem Schwenkbecher-Rotor zentrifugiert. Die Oozysten befanden sich im oberen Gradienten und wurden auf den 50 %igen Gradienten aufgetragen. Eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wie vorher ließ eine „saubere“ Oozystenbande entstehen, welche abgenommen und mit mindestens 40 % (v/v) Wasser gemischt wurde. Im nächsten Zentrifugationsschritt (20 min, 400 x g) sedimentierten die Oozysten.

Für die Excystierung wurde das Sediment mit sterilem Inkubationsmedium versetzt, in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche übertragen und in 100 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C 20 h im Brutschrank inkubiert.

Die Oozysten wurden hiernach abzentrifugiert, das Sediment in Excystiermedium (37 °C) aufgenommen und in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Die Excystierung fand bei 37 °C in 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre statt, wobei man stündlich mikroskopisch kontrollieren musste. Für gewöhnlich war die Excystierung nach 3 bis 4 h abgeschlossen.

Sobald die Excystierung zu mindestens 50 % erfolgt war, wurde die Suspension bei 400 x g 10 min zentrifugiert und das Pellet anschließend dreimal mit IMDM oder RPMI gewaschen, um Reste des Excystiermedium, insbesondere der Rindergalle zu entfernen. Die Sporozoitenzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### **3.3 Wirtszelllinien**

#### **3.3.1 Bovine fetale Gastrointestinalzellen (BFGC)**

Material:

- ❖ BFGC
- ❖ Iscove's modified dulbecco's medium (IMDM, Sigma); vor der Verwendung müssen zu je 500 ml Medium  
5 ml L-Glutamin-Penicillin-Streptomycin (L-Glut. Pen.-Strep., Sigma) und 50 ml Fetales Kälberserum (FKS, Biochrom) zugegeben werden.

## ❖ Versenpuffer (zu je 200 ml portioniert und autoklaviert)

136,9 mM NaCl, 8 g/l (Roth)  
2 mM KCl, 0,2 g/l (Roth)  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,145 g/l (Roth)  
1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g/l (Merck)  
5,3 mM EDTA, 0,2 g/l (Sigma)  
H<sub>2</sub>O

## ❖ Gepufferte Trypsinlösung (steril filtriert und zu 50 ml bei –20 °C aufbewahrt)

136,9 mM NaCl, 8 g/l (Roth)  
5 mM KCl, 0,38 g/l (Roth)  
7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,125 g/l (Roth)  
5,5 mM Glucose, 1 g/l (Merck)  
0,82 mM Tris, 3 g/l (MP Biomedicals)  
2,5g Trypsin 1:250 (Sigma)  
H<sub>2</sub>O

## ❖ Trypsin/Versen Puffer: zu einem Teil gepufferte Trypsinlösung werden vier Teilen Versenpuffer gegeben

## ❖ Fetales Kälberserum (FKS, Biochrom)

❖ 25 cm<sup>2</sup> und 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Nunc)

## Durchführung:

Ursprünglich wurden BFGC I aus der Dünn- und Dickdarmschleimhaut 4-6 Monate alter Rinderfeten isoliert und immortalisiert (Hermosilla et al., 2002). Die entstandene Zelllinie wurde mit IMDM, welches mit 10 % FKS und 1 % L- Glutamin Pen.-Strep. versetzt wurde, in 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gehalten. Der Mediumwechsel bei adhärennten Zellen erfolgte jeden zweiten Tag.

Die Subkultivierung des konfluenten Zellrasens erfolgte nach einmaligem Waschen mit 0,9 % iger NaCl-Lösung durch Zugabe von mit Trypsin versetztem Versenpuffer (4 ml pro 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche bzw. 10 ml pro 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche). Nach einigen Minuten lösten sich die Zellen bei 37 °C und wurden in Zentrifugenröhrchen überführt, die mit dem jeweils gleichen Volumen IMDM + FKS und L-Glutamin Pen.-Strep. bestückt waren.

Die Zellen des Pellets, das nach Zentrifugation (10 min, 1500 U/min) entstanden ist, wurden in Medium resuspendiert auf drei neue Zellkulturflaschen verteilt.

### 3.3.2 African Green Monkey Kidney Cells (Vero)

#### Material:

- ❖ Vero-Zellen
- ❖ RPMI 1640-Medium (Gibco); vor der Verwendung müssen auf 500 ml Medium 5 ml Penicillin-Streptomycin (ECACC, Salisbury, UK) und 50 ml FKS zugegeben werden.
- ❖ 25 cm<sup>2</sup>- und 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Nunc)
- ❖ Versenpuffer (siehe 3.3.1.)
- ❖ Gepufferte Trypsinlösung (siehe 3.3.1.)
- ❖ Trypsin/Versen Puffer (siehe 3.3.1.)
- ❖ FKS (Biochrom)

#### Durchführung:

Die permanente, adhärente Zelllinie Vero wurde von der European Collection of Cell Cultures (ECACC) unter der Nummer ECACC 84113001 gekauft.

Die Erhaltung und Subkultivierung dieser Zellen unterschied sich vom Verfahren 3.3.1. nur in der Verwendung unterschiedlicher Medien (hier RPMI 1640-Medium)

### 3.3.3 Bovine Umbilical Vein Cells (BUVEC)

#### Material:

- ❖ BUVEC
- ❖ Modifiziertes Endothelial Cell Growth Medium (ECGM Biowest), zu ECGM wurde das mitgelieferte Supplement gegeben, 150 ml dieser Lösung wurde mit 350 ml M199-Medium (Biowest) gemischt, dazu wurden 5 ml Penicillin Streptomycin gegeben
- ❖ 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Nunc)

#### Durchführung:

Für vorliegende Versuche wurden die Zellen freundlicherweise von Dr. C. Hermosilla zur Verfügung gestellt.

Die Erhaltung dieser Zellen entsprach abgesehen von dem verwendeten Medium dem Verfahren unter 3.3.1. Eine Subkultivierung war nicht möglich.

#### 3.3.4 Infektion der Wirtszellen

Material:

- ❖ BFGC
- ❖ Vero-Zellen
- ❖ BUVEC
- ❖ Sporozoiten in RPMI (für Vero-Zellen) oder IMDM (für BFGC und BUVEC)

Durchführung:

Um eine Infektionsrate von 50 %-60 % zu erreichen, mussten im Falle von konfluenten BFGC in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche  $2,5 \times 10^6$  Sporozoiten zugegeben werden, in eine 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche  $1 \times 10^6$  Sporozoiten, in eine 12er Loch-Platte  $2,5 \times 10^5$  Sporozoiten pro Vertiefung und in 8er Chamber Slides (Falcon)  $4 \times 10^4$  Sporozoiten pro Kammer.

Für Vero-Zellen galt:  $3,5 \times 10^6$  Sporozoiten pro 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche,  $1,5 \times 10^6$  Sporozoiten pro 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche und  $5 \times 10^4$  Sporozoiten pro Kammer in 8er Chamber Slides.

BUVEC wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit  $2,2 \times 10^6$  Sporozoiten infiziert.

### 3.4 Apoptoseinduktoren

#### 3.4.1 Actinomycin D

Material:

- ❖ Actinomycin D (*Streptomyces* sp.) 200 µg (Calbiochem)
- ❖ RPMI (Gibco) mit 10 % FKS und 1 % Pen.-Strep. versetzt
- ❖ IMDM (Sigma) mit 10 % FKS und 1 % L-Glut. Pen.-Strep versetzt

Um eine gebrauchsfertige Lösung zu erhalten wurden 200 µg Actinomycin D mit 2 ml des entsprechenden Mediums versetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

### 3.4.2 Cytochalasin B

Material:

- ❖ Cytochalasin B (*Helminthosporium dematioides*) 1 mg (Sigma)
- ❖ Dimethylsulfoxid (DMSO, Roth)

Zu 1 mg pulverisiertem Cytochalasin B wurden 4 ml DMSO gegeben und bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

### 3.4.3 Colchicin

Material:

- ❖ Colchicin, Plant Cell Culture, approx. 95 % HPLC, 500mg (Sigma)
- ❖ RPMI (Gibco) mit 10 % FKS und 1 % Pen.-Strep. versetzt
- ❖ IMDM (Sigma) mit 10 % FKS und 1 % L-Glut. Pen.-Strep versetzt

5 mg Colchicin wurden in 50 ml des jeweiligen Mediums gegeben und anschließend lichtgeschützt bei Zimmertemperatur gelagert.

### 3.4.4 Bestimmung der notwendigen Konzentrationen der Apoptoseinduktoren für BFGC

Material:

- ❖ BFGC
- ❖ IMDM (Sigma) mit 10 % FKS und 1 % L- Glut. Pen.-Strep versetzt
- ❖ Actinomycin D (siehe 3.4.1.)
- ❖ Cytochalasin B (siehe 3.4.2.)
- ❖ Colchicin (siehe 3.4.3.)
- ❖ 24er Loch-Platten (Nunc)
- ❖ Invertlichtmikroskop (Leica DM IRB)

Durchführung:

Die Zellen einer konfluenten 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurden auf eine 24 Loch-Platte verteilt und so lange kultiviert, bis der Zellmonolayer dicht gewachsen war. Dann wurden in unten angegebenen Verdünnungsschritten die Apoptoseinduktoren zugegeben. Der Anteil toter

Zellen wurde lichtmikroskopisch nach 3, 6, 12, 24 und 48 h kontrolliert, bis ca. 50 % der Zellen entsprechende Veränderungen aufwiesen.

**Tabelle 4**

**Verwendete Konzentrationen der Apoptoseinduktoren für BFGC [ $\mu\text{g/ml}$ ]**

ActinomycinD	0,05	0,1	0,5	1	2	4
Cytochalasin	0,1	0,5	1	2	4	8
Colchicin	0,1	0,5	1	2	4	8

**3.4.5 Bestimmung der notwendigen Konzentrationen der Apoptoseinduktoren für Vero-Zellen**

Material:

- ❖ Vero-Zellen, African Green Monkey Kidney Cells
- ❖ RPMI (Gibco) mit 10 % FKS und 1 % Pen.- Strep. versetzt
- ❖ Actinomycin D (siehe 3.4.1.)
- ❖ Cytochalasin B (siehe 3.4.2.)
- ❖ Colchicin (siehe 3.4.3.)
- ❖ 24er Loch-Platten
- ❖ Invertlichtmikroskop (Leica DM IRB)

Durchführung:

Die Durchführung entsprach der obigen Beschreibung bei folgenden Verdünnungsschritten:

**Tabelle 5**

**Verwendete Konzentrationen der Apoptoseinduktoren für Vero-Zellen [ $\mu\text{g/ml}$ ]**

ActinomycinD	0,05	0,1	0,5	1	2	4			
Cytochalasin	0,1	0,5	1	2	4	5	6	7	8
Colchicin	0,1	0,5	1	2	4	5	6	7	8

### 3.5 Lichtmikroskopische Darstellung der Apoptose

Material:

- ❖ BFGC
- ❖ Vero-Zellen
- ❖ BUVEC
- ❖ IMDM (Sigma) mit 10 % FKS und 1 % L- Glut. Pen.-Strep versetzt
- ❖ RPMI (Gibco) mit 10 % FKS und 1 % Pen.- Strep. Versetzt
- ❖ Modifiziertes ECGM (Biowest)
- ❖ Sporozoiten
- ❖ Actinomycin D (siehe 3.4.1.)
- ❖ Cytochalasin B (siehe 3.4.2.)
- ❖ Colchicin (siehe 3.4.3.)
- ❖ 8er Chamber Slides (Falcon)
- ❖ Invertlichtmikroskop DM IRB (Leica)
- ❖ Digitalkamera DC 5000 (Leica)

Durchführung:

Der Inhalt einer Flasche der jeweiligen Zelllinie wurde auf zwei 8er Chamber Slides verteilt. Das bei 1500 U/min 10 min abzentrifugierte Zellpellet einer Flasche wurde in 2 ml Medium aufgenommen und auf die 8 Vertiefungen verteilt, die hierfür mit 400 µl Medium pro Kammer versehen worden waren. Wenn eine ca. 80 %ige Konfluenz des Zellrasens erreicht war, wurde die Hälfte der Vertiefungen genutzt, um die Zellen zu infizieren.

Im Falle der Vero-Zellen  $5 \times 10^4$  Sporozoiten pro Vertiefung und im Falle der BFGC  $4 \times 10^4$ . 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach der Infektion wurden die Apoptoseinduktoren zugegeben.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und die Veränderungen fotografisch dokumentiert.

Im Falle von BUVEC wurde keine Apoptose induziert. Der programmierte Zelltod stellte sich aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Zellen von selbst ein und wurde ebenso fotografiert.

### 3.6 Apoptosenachweis mittels TUNEL-Assay

Material:

- ❖ BFGC
- ❖ Vero-Zellen
- ❖ Sporozoiten
- ❖ IMDM (Sigma) mit 10 % FKS und 1 % L- Glut. Pen.-Strep versetzt
- ❖ RPMI (Roth) mit 10 % FKS und 1 % Pen.- Strep. Versetzt
- ❖ Actinomycin D (siehe 3.4.1.)
- ❖ Cytochalasin B (siehe 3.4.2.)
- ❖ Colchicin (siehe 3.4.3.)
- ❖ In Situ Cell Death Detection Kit<sup>®</sup>, Fluorescein (Roche)
- ❖ 1 x PBS
- ❖ Paraformaldehyd 10 %ig, 10 g Paraformaldehyd (Serva) wurden in 60 ml H<sub>2</sub>O nach Zugabe von 2- 3 Tropfen 1N NaOH bei 45-60 °C gelöst. Die Lösung wurde auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt, durch ein Filterpapier filtriert und als Aliquots bei –20 °C gelagert
- ❖ Paraformaldehyd 4 %ig in PBS aus einer 10 %igen Stammlösung, 40 ml Paraformaldehyd 10%ig wurde mit 60 ml PBS gemischt
- ❖ Permeabilisationslösung aus 0,1 % Triton X-100 (Sigma) in 0,1 % Natriumzitat (Sigma)
- ❖ 8er Chamber Slides (Falcon)
- ❖ Fluoreszenzmikroskop (Leica, Leitz Diaplan)

Durchführung:

TUNEL bedeutet terminal desoxyribosyl transferase mediated dUTP nick end labeling.

Das Prinzip des Tests basiert darauf, dass bei der Apoptose genomische DNA fragmentiert wird und sowohl doppelsträngige Fragmente mit niedrigem Molekulargewicht, als auch einzelsträngige Fragmente mit hohem Molekulargewicht entstehen. Die freien 3'-OH Enden



werden von der terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase markiert und die Polymerisation der markierten Nukleotide wird katalysiert. Die polymerisierten Nukleotide werden mit Fluoreszein markiert, sodass diese unter einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden kann.

Die Apoptoseinduktion entsprach der im Abschnitt 3.5. Die Proben wurden zunächst luftgetrocknet und anschließend für 1h bei 15-25 °C mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Danach folgte ein Waschen der Zellen mit PBS. Anschließend wurde die Permeabilisierungslösung zugegeben, und die Zellen 2 min auf Eis (Vero-Zellen), oder 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (BFGC). Es folgten zwei Waschschrte mit PBS, woraufhin jeder Ansatz mit 50 µl TUNEL-Reaktionslösung versehen wurde, und die Chamber Slides als feuchte Kammer bei 37 °C für 60 min im Dunkeln inkubiert wurden. Die Reaktionslösung wurde nach Angaben des Herstellers des Kits mit 50 µl Enzymlösung und 450 µl Markierungslösung hergestellt bzw. mit dem entsprechenden Bruchteil des Volumens je nach Anzahl der zu färbenden Kammern.

Als Negativkontrolle wurden zwei Vertiefungen mit fixierten und permeabilisierten Zellen mit reiner Markierungs-Lösung versehen und inkubiert. Als Positivkontrolle wurden fixierte und permeabilisierte Zellen mit der mitgelieferten DNase I inkubiert und 10 min bei 15-25 °C inkubiert, um Strangbrüche zu induzieren, bevor die Proben mit der Reaktionslösung behandelt wurden.

Nach einer Inkubation für 60 min bei 37 °C im Dunkeln wurden die Kammern drei Mal mit PBS gewaschen und konnten anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einer Wellenlänge von 450-550 nm analysiert werden.

### 3.7 Annexin V-Test

#### 3.7.1 Bestimmung AnnexinV positiver Zellen

Material:

- ❖ BFGC in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen
- ❖ Vero Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen
- ❖ IMDM (Sibma) mit 10 % FKS und 1 % L- Glut. Pen.-Strep versetzt
- ❖ RPMI (Gibco) mit 10 % FKS und 1 % Pen.- Strep. versetzt
- ❖ Sporozoiten
- ❖ Actinomycin D (siehe 3.4.1.)

- ❖ Cytochalasin B (siehe 3.4.2.)
- ❖ Colchicin (siehe 3.4.3.)
- ❖ Trypsin/Versen-Puffer
- ❖ Acutase (PAA Laboratories Austria)
- ❖ Annexin V, FITC Apoptosis Detection Kit I<sup>®</sup> (BD Pharmingen)
- ❖ 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- ❖ Neubauer-Zählkammer
- ❖ Fluoreszenzmikroskop (Leica, Leitz Diaplan)

#### Durchführung:

Bei dieser Art, die Apoptose einer Zelle nachzuweisen, spielen membranständige Phosphatidylserine, die in einer intakten Zelle zur zytosolischen Seite gerichtet sind, die entscheidende Rolle. Nachdem der programmierte Zelltod eingeleitet wird, evertieren Phosphatidylserine nach außen, um die Zelle zu markieren. Somit können sie von Phagozyten erkannt und eliminiert werden. An diese Phosphatidylserine bindet Annexin V, das selbst am Farbstoff FITC gekoppelt ist, was eine Visualisierung der apoptotischen Zelle ermöglicht. Pro Zellreihe wurden in drei Zellkulturflaschen mit einem konfluenten Zellerasen infiziert (BFGC:  $1 \times 10^6$  Sporozoiten pro  $25 \text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche, Vero-Zellen:  $1.5 \times 10^6$  Sporozoiten pro  $25 \text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche). Zellen aus vier weiteren Zellkulturflaschen dienten als Kontrolle und wurden nicht infiziert. Jeweils eine infizierte und eine nicht infizierte Zellpopulation wurden mit Actinomycin D (BFGC  $2,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , Vero-Zellen  $3,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ), Cytochalasin B (BFGC  $12,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , Vero-Zellen  $15 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) bzw. Colchicin (BFGC  $8 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , Vero-Zellen  $25 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) versetzt. In einer Flasche pro Zellreihe verblieben die Zellen nicht infiziert und nicht behandelt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und für 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Alternativ zu Trypsin wurde auch Acutase verwendet, wobei sich das Prozedere des Ablösens nicht unterschied.

Circa  $3 \times 10^5$  Zellen pro Flasche wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und mit 50  $\mu\text{l}$  Annexinpuffer und 2  $\mu\text{l}$  Annexin V versehen. Die Zellsuspensionen wurden 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend mittels Durchlicht-Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, wobei der Anteil Annexin V-positiver Zellen erfasst wurden. Pro Ansatz wurden in der Zählkammer nach Neubauer insgesamt 120-150 Zellen ausgewertet.

### 3.7.2 Vitalfärbung mit Trypanblau

Material:

- ❖ BFGC in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen
- ❖ Vero Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen
- ❖ IMDM (Sibma) mit 10 % FKS und 1 % L- Glut. Pen.-Strep versetzt
- ❖ RPMI (Gibco) mit 10 % FKS und 1 % Pen.- Strep. versetzt
- ❖ Actinomycin D (siehe 3.4.1.)
- ❖ Cytochalasin B (siehe 3.4.2.)
- ❖ Colchicin (siehe 3.4.3.)
- ❖ Trypsin/Versen-Puffer
- ❖ 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf )
- ❖ Trypanblau (Merck)
- ❖ Neubauer-Zählkammer
- ❖ Invertlichtmikroskop DM IRB (Leica)

#### Durchführung

Nachdem bei den jeweiligen konfluenten Vero- und BFGC-Zellrasen einer 24er Lochplatte die Apoptose induziert worden war (für Vero-Zellen 0,5µg/ml Actinomycin D, 8µg/ml Cytochalasin B und 7µg/ml; für BFGC 0,5µg/ml Actinomycin D, 2µg/ml Cytochalasin B und 2µg/ml Colchicin), wurde der Anteil Trypanblau-positiver Zellen nach dem Trypsinieren, nach dem Trypsinieren und einer 4-stündigen Lagerung auf Eis und nach dem Färbevorgang mit Annexin V-PE (Caltac Laboratories) bestimmt. Dazu wurde das Zellmaterial 1:9 mit Trypanblau vermischt und die Rate positiver Zellen unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer mittels Invertmikroskop ausgezählt. Diese Methode wurde auch für apoptoseinduzierte Vero-Zellen nach 14 h, 24h und 48 h angewendet.

### 3.8 Caspase 3-Nachweis mittels Fluoroscans

Material:

- ❖ BFGC in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen
- ❖ Vero-Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen
- ❖ IMDM (Sigma) mit 10 % FKS und 1 % L- Glut. Pen.-Strep versetzt
- ❖ RPMI (Gibco) mit 10 % FKS und 1 % Pen.- Strep. versetzt
- ❖ Sporozoiten
- ❖ Actinomycin D (siehe 3.4.1.)
- ❖ Cytochalasin B (siehe 3.4.2.)
- ❖ Colchicin (siehe 3.4.3.)
- ❖ Trypsin/Versen-Puffer
- ❖ 1 x PBS
- ❖ Enz Check<sup>®</sup> Caspase 3 Assay Kit #2 (Molecular Probes)
- ❖ Neubauer-Zählkammer
- ❖ Mikrotiterplatten (96 Loch)
- ❖ Fluoroscans Ascent (LabSystems )

Durchführung:

Caspase 3 ist die übergeordnete Effektorcaspase, die beim programmierten Zelltod in einer proteolytischen Kaskade weitere Effektorkaspasen aktiviert.

Die aktive Caspase 3 besitzt eine Substratspezifität für die Aminosäuresequenz Asp-Glu-Val-Asp (DEVD). Caspase 3 und auch andere DEVD-spezifische Proteaseaktivitäten werden durch den Farbstoff Rhodamin-110 (R-110), welcher an DEVD kovalent gebunden ist, nachgewiesen.

Pro Induktor wurden 6 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen konfluente BFGC und 6 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen konfluenter Vero-Zellen benötigt. Davon wurde jeweils die Hälfte mit der entsprechenden Anzahl Sporozoiten infiziert (im Falle der BFGC 2,5 x10<sup>6</sup> Sporozoiten pro Flasche, im Falle der Vero-Zellen 1,5 x10<sup>6</sup> Sporozoiten pro Flasche). Darüber hinaus wurden als Negativkontrolle 3 nicht infizierte, nicht induzierte 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen BFGC und 3 nicht infizierte, nicht induzierte 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen Vero-Zellen benötigt.

Um einen möglichst optimalen Caspase 3-Nachweis zu führen, war bei den verwendeten Zellreihen und Induktoren eine Inkubationsdauer von 5 Stunden nötig. Die Induktorkonzentrationen der Vero-Zellen entsprachen denjenigen, die für den AnnexinV-Nachweis verwendet wurden. Für BFGC galt Folgendes: 12 µg/ml Actinomycin D, 60 µg/ml Cytochalasin und 35 µg/ml Colchicin.

Die mit Versen/Trypsin-Puffer abgelösten und zentrifugierten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Pro Reaktionsansatz mussten  $1 \times 10^6$  Zellen in jede Vertiefung der 96er-Lochplatte gegeben werden. Den Zellen wurde der mitgelieferte Zelllysispuffer (50 µl/Napf) zugefügt und die Platte wurde zunächst 20 min auf Eis gelegt. Anschließend wurde sie wieder auf Raumtemperatur gebracht, um die Lysis zu verbessern. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand wurde gewonnen und davon wurden je 50 µl in die Vertiefungen einer weiteren 96er Lochplatte übertragen. Zur Kontrolle der Hintergrundfluoreszenz wurde eine Portion des übertragenen Überstandes genutzt, indem diese nicht in die weiteren Färbeschritte einbezogen wurde.

Die übrigen Proben wurden mit der aus den Komponenten des Kits hergestellten Substratlösung zu je 50 µl bestückt und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die fertigen Proben wurden unmittelbar danach bei einer Wellenlänge von 496-520 nm mit einem Fluoroscan gemessen.

### 3.9 Cytochrom-c-Nachweis mittels ELISA

Material:

- ❖ BFGC I in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen
- ❖ IMDM (Sigma) mit 10 % FKS und 1 % L- Glut. Pen.-Strep versetzt
- ❖ Sporoziten
- ❖ Actinomycin D (siehe 3.4.1.)
- ❖ Cytochalasin B (siehe 3.4.2.)
- ❖ Colchicin (siehe 3.4.3.)
- ❖ Trypsin/Versen-Puffer
- ❖ 1x PBS
- ❖ Zymed<sup>®</sup> Cytochrome c ELISA Kit (Zymed<sup>®</sup> Laboratories Inc.) incl. der notwendigen Assay- und Waschpuffer

- ❖ 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- ❖ Molecular Devices E<sup>max</sup> precision microplate reader (MWG Biotech)

#### Durchführung:

Cytochrom-c spielt beim sogenannten inneren oder mitochondrialen Weg der Apoptose eine entscheidende Rolle. Wird dieser Weg beschritten, kommt es zu einer Ausschüttung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien in das Cytosol als erster Schritt in Richtung Caspaseaktivierung und programmiertem Zelltod.

Der Kit nutzt 96er Mikrotiterplatten, deren Vertiefungen mit monoklonalem Antikörper gegen Cytochrom-c aus der Maus beschichtet sind. Das gesuchte Protein bindet daran und kann von einem Biotin-konjugierten Antikörper erfasst werden. Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (HRP) wird zugefügt und lagert sich an den Biotin-konjugierten Antikörper.

Um eine Farbreaktion zu erlangen wird eine Substratlösung zugegeben. Das Ergebnis kann bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels ELISA-Reader abgelesen werden.

Um ausreichendes Zellmaterial zu Verfügung zu haben, wurden pro Induktor sechs 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen benötigt, davon jeweils drei Flaschen mit infizierten und drei Flaschen mit nicht infizierten Zellen, sowie drei Flaschen mit nicht infizierten nicht induzierten Zellen als Negativkontrolle. Die Induktorkonzentrationen entsprachen denen des Caspase 3-Nachweises. Acht Stunden nach der Induktion wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert und anschließend einmal mit eiskalter PBS gewaschen. Nun wurden pro Ansatz 1,5x10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml Lysispuffer resuspendiert und 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 1000 x g, woraufhin der Überstand mit dem Assaypuffer 1:50 verdünnt wurde.

Die Mikrotiterplatte wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen worauf in alle benötigten Vertiefungen Assaypuffer gegeben wurde. Mit dem mitgelieferten Cytochrom-c-Standard wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe angefertigt. Jeweils 100 µl der verdünnten Proben wurden in die entsprechenden Vertiefungen der Lochplatte pipettiert, woraufhin je 50 µl Biotinkonjugat zugegeben wurden. Im Anschluss wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann dreimal gewaschen. Alle Vertiefungen wurden daraufhin mit 100µl Streptavidin-HRP versehen und 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sich ein weiterer Waschschrift anschlossen und 100 µl TMB Substrat-Lösung zugegeben wurden. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mussten je 100 µl Stopp-Lösung in die Vertiefungen pipettiert werden und das Ergebnis musste unmittelbar danach von einem ELISA-Reader bei 440-460 nm Wellenlänge gelesen werden.

### 3.10 Konfokalmikroskopie

#### 3.10.1 Vorbereitung der Präparate

Material:

- ❖ BFGC I in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen
- ❖ IMDM (Sigma) mit 10 % FKS und 1 % L-Glut. Pen.-Strep versetzt
- ❖ Trypsin/Versen Puffer
- ❖ Sporozoiten
- ❖ Colchicine (siehe 3.4.3.)
- ❖ Texas Red (Invitrogen)
- ❖ 1x PBS
- ❖ Paraformaldehyd 3 %ig aus einer 10 %igen Stammlösung (Lagerung bei –20°C für 6 Monate möglich)
- ❖ 12er Lochplatten (Nunc)
- ❖ autoklavierte 12 mm Deckgläschen

Durchführung:

Um die Mechanismen der Apoptosehemmung in *E. bovis* infizierten Zellen zu analysieren wurde überprüft, welche intrazellulären Apoptoseinhibitoren im Vergleich zu nicht infizierten aktiviert werden. Die Untersuchung bezog als Inhibitoren c-IAP1, c-FLIP und Bcl2 ein und wurde mit Hilfe eines Konfokalmikroskops durchgeführt.

In die Vertiefungen einer 12 Lochplatte, die mit autoklavierten 12 mm Deckgläschen bestückt wurden, wurden die Zellen einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit einer sterilen Pipette verteilt und im Brutschrank inkubiert. Die Sporozoiten wurden vor der Infektion mit Texas Red gefärbt, wobei 2 µl Texas Red für 6 x 10<sup>5</sup> Sporozoiten benötigt wurden. Die Parasiten wurden daraufhin mit 1 ml Medium für 1 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach einem 3-4maligen Waschen mit PBS konnten die gefärbten Sporozoiten für die Infektion verwendet werden (2,5 x 10<sup>5</sup> Sporozoiten/Vertiefung).

Drei oder fünf Tage nach der Infektion wurden infizierte und nicht infizierte Zellen mit 0,03 µg/ml Colchicin 48 h inkubiert. Als Kontrolle wurden nicht induzierte und nicht infizierte Zellen eingesetzt.

Nach zwei Tagen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 3 %igem Paraformaldehyd über Nacht bei 4 °C fixiert.

### 3.10.2 Färbung der Präparate

Material:

- ❖ 1x PBS
- ❖ Triton X- 100 (Sigma)
- ❖ Konfokalpuffer aus 1 % BSA Albuminfraktion V (Roth), 5 % Ziegenserum, 10 % 1xPBS
- ❖ Primärantikörper gegen c-IAP1 (H- 83; Santa Cruz Biotechnology), Bcl-2 (C- 2; Santa Cruz Biotechnology), FLIP (BD Pharmingen™)
- ❖ Sekundärantikörper: FITC- Conjugate anti rabbit developed in goat (Sigma)
  - FITC- Conjugate anti mouse developed in goat (Sigma)
- ❖ Kernfärbung Toto- 3 iodide (Molecular Probes)
- ❖ Mowiol 4.88 (Calbiochem), Antifading Propylgallat (Sigma)
- ❖ Aqua dest.
- ❖ Parafilm

Durchführung:

Nach der Fixierung wurden die Zellen in den Vertiefungen zwei mal mit PBS gewaschen und mit Triton X-100, 0.1 %ig in 1xPBS verdünnt, 10min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen und einer Inkubation der Zellen mit dem angefertigten Konfokalpuffer für weitere 15 min bei 37 °C wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten für 60 min bei 37°C mit 30 µl Primärantikörper (3 %ig in Konfokalpuffer), die sich auf Parafilm in einer feuchten Kammer befanden, inkubiert.

Die Deckgläschen werden vorsichtig mit 100 µl 1xPBS aufgespült, in die Vertiefungen der 12 Lochplatte gelegt und vier mal gewaschen.

Auf neue Parafilmstückchen wurden 30 µl des 1:50 in Konfokalpuffer verdünnten Sekundärantikörpers pipettiert. Für c-IAP1 und c-FLIP wurde FITC-conjugate anti rabbit benutzt, für Bcl-2 FITC-conjugate anti mouse.



Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Deckgläschen abermals aufgespült und wie oben beschrieben gewaschen, mit 200 µl 1 µM Toto-3 versehen und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Nach einem kurzen, vorsichtigen Abspülen mit Aqua dest. können die Präparate in Mowiol über Nacht eingebettet werden.

### 3.10.3 Mikroskopie

Material:

- ❖ Konfokalmikroskop (Leica DM IRBE)
- ❖ Konfokale Laserscaneinheit (Leica TCS NT, LEICA, Lasertechnik Heidelberg)
- ❖ Leica TCS NT-Software, Version 1.6.551
- ❖ Bildbearbeitungsprogramm ADOBE Photoshop, Version D1-4.0 (ADOBE System, Inc.)

Durchführung:

Die Aufnahmen wurden unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Kann, Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen angefertigt.

Dazu wurde eine 630 fache optische Vergrößerung gewählt, wobei ein 63x Leica Apochromat-Objektiv und eine Pinhole Größe von 1 verwendet wurde. Drei Kanäle des Argon-Krypton Lasers mit 488 nm, 567 nm und 648 nm wurden genutzt. Die emittierten Signale wurden über einen Photomultiplier aufgenommen, digitalisiert und elektronisch erfasst.

Die Einstellung der Verstärkung der einzelnen Kanäle erfolgte anhand einer Probe mit infizierten Zellen, da hierbei die stärksten Signale erwartet wurden und einer uninfizierten Kontrolle, deren Signal auf schwach sichtbar justiert wurde. In der sich anschließenden Bildbearbeitung wurden die separaten Bilder der drei Kanäle eines Präparates nebeneinander gesetzt. Zum besseren Vergleich der Grünfluoreszenz erfolgte eine direkte Gegenüberstellung der Aufnahmen von infizierten und nicht infizierten Präparaten dieses Kanals.

### 3.10.4 Quantifizierung der Fluoreszenzintensität

Material:

- ❖ Bildbearbeitungsprogramm ADOBE Photoshop, Version D1-4.0 (ADOBE System, Inc.)
- ❖ Image Quant<sup>®</sup> (Molecular Dynamic)
- ❖ Microsoft Excel

Durchführung:

Zur Quantifizierung der optisch dargestellten Fluoreszenzunterschiede des Grünkanals in infizierten und nicht infizierten Zellen wurden die entsprechenden Aufnahmen im ADOBE Photoshop in Graustufenbilder umgewandelt und als TIF-Dateien gespeichert.

In dem Programm Image Quant<sup>®</sup> wurden 120 der ausgewählten Zellen einzeln umrandet. Zusätzlich wurde ein Areal markiert, das den Hintergrund des jeweiligen Bildes repräsentierte.

Das Programm bestimmt die Signalstärke (=Volume, V) der zuvor eingegrenzten Flächen/Pixel (=Area, A). Um den Hintergrund (=Background, BG) von den dazugehörigen Bereichen abzuziehen, wurde zunächst der Hintergrunds durch dessen Fläche/Pixel geteilt und mit den Werten von der jeweiligen markierten Zellen multipliziert. Dieser Wert wurde dann von der Signalstärke (V) jeweils abgezogen (Sum-BG).

$$[V_{1,...,n} - (V_{BG}/A_{BG}) \times A_{1,...,n}] : A_{1,...,n}$$

Die errechneten Werte konnten dann in einer Graphik umgesetzt werden. Da eine Normalverteilung der Werte vorlag, wurde für die statistische Auswertung ein einseitiger t-Test gewählt. Zur Darstellung parakriner Effekte werden in infizierten Präparaten die infizierten Zellen und deren benachbarte nicht infizierte Zellen markiert und die Fluoreszenzintensitäten wie oben miteinander verglichen.

### 3.11 Western Blot und Immunfärbung

#### 3.11.1 Vorbereitung des Zellmaterials

Material:

- ❖ BFGC I in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen
- ❖ Jurkat-Zellen
- ❖ Human cervical carcinoma cells, Henrietta Lacks Zellen (HeLa)
- ❖ Sporoziten

- ❖ IMDM, mit 10 % FKS und 1 % L-Glut. Pen.-Strep versetzt
- ❖ RPMI, mit 10 % FKS und 1 % Pen.- Strep. versetzt
- ❖ Actinomycin D (siehe 3.4.1.)
- ❖ Cytochalasin B (siehe 3.4.2.)
- ❖ Colchicin (siehe 3.4.3.)
- ❖ 1x PBS
- ❖ Rubber Police (Nunc)
- ❖ 50 ml Zentrifugenröhrchen (Nunc)
- ❖ 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf )

#### Durchführung

Zur Bestätigung der Ergebnisse der konfokalmikroskopischen Untersuchung wurde der Versuch gemacht, die Apoptoseinhibitoren c-IAP1, Bcl2 und FLIP in infizierten und nicht infizierten BFGC vergleichend zu quantifizieren.

Für jede Untersuchung der Apoptoseinhibitoren c-IAP1, FLIP und Bcl2 wurde das Zellmaterial von je zwei infizierten und nicht infizierten 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen benötigt. Pro infizierte Flasche wurden 1x10<sup>6</sup> Sporozoiten verwendet. Die Apoptose wurde 2, 3, 5 und 6 Tage p.i. mit den Induktoren Actinomycin D, Cytochalasin und Colchicin in der unter 3.7. angegebenen Konzentration induziert. Als Positivkontrolle für die Antikörper c-IAP1 und Bcl-2 dienten Jurkat-Zellen, für c-FLIP HeLa-Zellen. Diese Zellen gehören zu permanenten Zelllinien und exprimieren die Apoptoseinhibitoren Bcl2, c-IAP1 bzw. c-FLIP obligat.

Nach der Inkubation der Zellen mit den Apoptoseinduktoren wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen, mit einem Rubber Police abgeschabt, in ein 50 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 1ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Nach erneutem Waschen wurden die Zellpellets bei –80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

#### 3.11.2 SDS-PAGE und Proteintransfer (Western Blot)

Material:

- ❖ 4x Tris HCl/SDS, pH 8,8 mit 1N HCl eingestellt
- 0,5 M Tris (MP Biomedicals)

0,4 % SDS (Serva)

- ❖ 4x Tris Cl/SDS, pH 6.8 mit 1 N HCl eingestellt

1.5 M Tris (MP Biomedicals)

0.4% SDS (Serva)

- ❖ Acrylamid/Bisacrylamid- Lösung: Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30 (Roth)
- ❖ mit Wasser gesättigtes Isobuthanol
- ❖ Ammoniumpersulfat, APS (Amersham Bioscience); 10 %ige Lösung (w/v) in H<sub>2</sub>O  
angesetzt und bei –20 °C aufbewahrt
- ❖ TEMED (Amersham Bioscience)
- ❖ 10x Elektroden-Laufpuffer, pH 8,3  
30,3 g Tris (MP Biomedicals)  
144,0 g Glycin (MP Biomedicals)  
10,0 g SDS (Serva)  
H<sub>2</sub>O ad 1000 ml
- ❖ 5x Probenpuffer pH 6.8  
19 mM Tris HCl (MP Biomedicals)  
10 % SDS (Serva)  
12,5 % 2-Mercaptoethanol (Serva)  
25 % Glycerol ultra pure (MP Biomedicals)  
0,005 % Bromphenolblau (Merck)
- ❖ Molekulargewichtsmarker: Bench Mark<sup>™</sup> Protein Ladder, 15 Banden, 10- 220 kDa  
(Invitrogen)
- ❖ PVDF-Transfermembran: Immobilon<sup>™</sup>- P (Millipore)

❖ Filterpapier 3 mm dick (Whatman)

❖ Transferpuffer

25 mM Tris (MP Biomedicals)

192 mM Glycin (MP Biomedicals)

15 % Methanol (Merck)

H<sub>2</sub>O

❖ Methanol (Merck)

❖ H<sub>2</sub>O

#### Durchführung:

Vor der Herstellung der Gellösung mit gewünschter Polyacrylamidkonzentration wurde der Gießstand mit den Glasplatten und den Spacern vorbereitet.

Für die Herstellung eines 10 %igen Acrylamidgels wurden 5 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 3,75 ml 4 x Tris-HCl/SDS, pH 8.8 und 6,25 ml H<sub>2</sub>O benötigt.

Direkt vor dem Gießen wurde die Mixtur mit 50 µl 10 x APS-Lösung und 10 µl TEMED versetzt. Die Mischung wurde mit Isobuthanol überschichtet, 30-60 min bei Raumtemperatur polymerisiert und mit 70 % Ethanol und H<sub>2</sub>O gespült. Das Sammelgel wurde als 3,9 % Acrylamidlösung (0,62 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung, 1,25 ml 4 x Tris:HCl/SDS (pH 6,8), 3,05 ml H<sub>2</sub>O, 0,25 µl 10 % APS und 5 µl TEMED) auf das polymerisierte Trenngel gegeben und die Kämme eingesetzt. Nach 30 minütiger Polymerisation des Sammelgels wurden die Gelkassetten in die Trennkammern eingesetzt, die Kämme wieder entfernt, die Geltaschen mit Elektrodenpuffer gespült und mit den Proben versehen (max. 10 µl).

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 10 mA über 15 min bis die Lauffront das Trenngel erreicht hat, wonach eine Stromstärke von 15 mA angelegt wurde. Nach der Elektrophorese (1,5 h) wurde das Sammelgel vom Trenngel getrennt und die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Membran geblottet: Die Gele wurden im Transferpuffer zusammen mit Filterpapier 15 min äquilibriert; die PVF-Transfermembran wurde zuerst kurz in Methanol und anschließend für 5 min in H<sub>2</sub>O gelegt, bevor auch diese 10-15 min im Transferpuffer äquilibriert wurde. Auf die Anode wurde ein Filterpapier gelegt und darauf die

Membran, das Trenngel und das zweite Filterpapier. Der Transfer fand bei 200 mA innerhalb 1 h statt.

### 3.11.3 Blockieren der Membran und Inkubation mit Antikörpern und Visualisierung der Reaktion

Material:

- ❖ PVDF- Membran mit geblottetem Protein
- ❖ Blockierungspuffer
  - 1x TBS
  - 0,1 % Tween 20 (Aldrich)
  - 4 % BSA (Roth)
- ❖ Inkubationspuffer
  - 1x TBS
  - 0,1 % Tween 20 (Aldrich)
  - 1 % BSA (Roth)
- ❖ Primärantikörper c- IAP (H-83; Santa Cruz Biotechnology), Bcl2 (C-2; Santa Cruz Biotechnology), I-Flice 1:100 (BD Pharmingen<sup>TM</sup>)
- ❖ Sekundärantikörper: FITC- Konjugat anti rabbit developed in goat 1:50.000 (Sigma)
- ❖ Waschpuffer
  - 1x TBS
  - 0,1 % Tween 20 (Aldrich)
- ❖ 10x TBS
  - 60,57g Tris·HCl (MP Biomedicals)
  - 85 g NaCl (Roth)
  - H<sub>2</sub>O ad 1000 ml

- ❖ Chemolumineszenz-Substrat zum Nachweis der Peroxidase: ECL+Plus<sup>TM</sup> Western Blotting Detection System (Amersham Bioscience). Die Lösungen A und B werden bei 4°C aufbewahrt, vor Anfertigung der Substratlösung ca. 30 min bei RT äquilibriert und vor der Anwendung im Verhältnis 40:1 (v/v) gemischt; Substratmenge 0,1 ml/cm<sup>2</sup> Membran
- ❖ 1x TBS
- ❖ Plastikfolie (Polystar PE-Schlauchfolie, Rische & Herfurth, Hamburg)
- ❖ Frischhaltefolie
- ❖ Kodak BioMax Light Film, BioMax Light- 1 (Sigma)
- ❖ Cronex MF-E-Fixierer
- ❖ Cronex MD-Entwickler

#### Durchführung:

Zur längerfristigen Aufbewahrung der gebloteten Antigene wurden die Membranen in Aqua dest. gewaschen und getrocknet. Wenn die Immunfärbung folgen sollte, wurden die Membranen in Blockierungs-Puffer verbracht und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4° C im Kühlraum auf der Rotationsplattform zur Absättigung von unspezifischen Proteinbindungsstellen inkubiert.

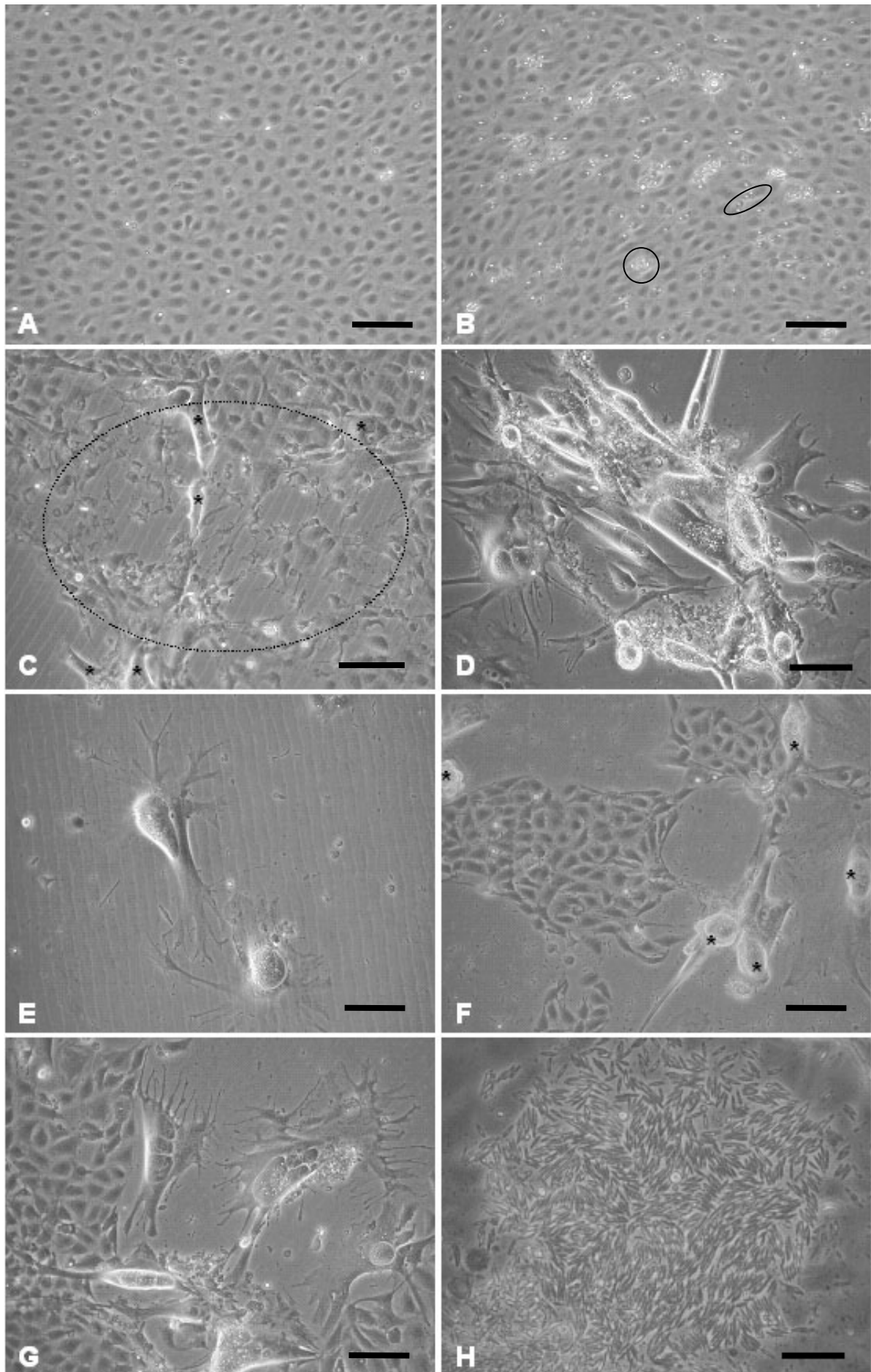
Nach der Blockierung wurde der Blockierungspuffer gegen die gewünschte Antikörperverschüttung ausgetauscht. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurden die Antikörper entfernt. Die unspezifisch gebundenen Proteine wurden durch 5 Waschschriffe im Waschpuffer (jeweils 10 min) beseitigt. Danach folgte die Inkubation (1 h, RT) in den mit Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpern. Danach wurden die Membranen wie oben mit Waschpuffer und einmal mit 1xTBS gewaschen. Für den Chemolumineszenznachweis wurden die Membranen abgetropft, in Plastikfolie eingeschweißt und für 5 min mit dem Substrat inkubiert. Nach Herausnahme und Abtropfen überschüssigen Substrats wurden die Membrane zwischen zwei Blättern Frischhaltefolie luftblasenfrei auf Röntgenfilme gelegt. Die Exponierungszeiten dauerten zwischen 1-30 min. Danach wurden die Filme bis zur gewünschten Farbintensität entwickelt und nach dem Spülen mit Wasser im Fixier-Bad fixiert. Nach einem erneuten Spülen mit Wasser wurden sie getrocknet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *In vitro* Entwicklung von *E. bovis* und Einfluss des Parasiten auf die Überlebensfähigkeit der Wirtszelle

Die These, dass *E. bovis* eine hemmende Wirkung auf den programmierten Zelltod der Wirtszelle haben könnte, resultiert u. a. aus Beobachtungen bei der Infektion von Endothelzellen (BUVEC) *in vitro*: Infiziert man konfluente BUVEC mit einer relativ hohen Infektionsdosis, so sterben ab Tag 10 p. i. viele nicht infizierte Zellen spontan ohne Induktion der Apoptose ab, während infizierte Zellen verbleiben und die Entwicklung von Schizonten erlauben. Dieses Phänomen ist in Abb.9 dokumentiert, die die Entwicklung in einem mit hoher Dosis ( $2,5 \times 10^4$  Sporozoiten/cm<sup>2</sup>) infizierten BUVEC-Zellrasen bis hin zur Merozoitenfreisetzung zeigt: Unmittelbar nach der Infektion blieb der Zellrasen intakt, und bis Tag 4 war auch keine mikroskopisch sichtbare Veränderung der Parasiten zu beobachten [Abb.9 (A), (B)]. Nach erfolgter Umformung der Parasiten zu Trophozoiten waren mit Tag 8 bis 10 p. i. erste unreife Schizonten zu sehen. Zeitgleich mit der beginnenden Expansion der infizierten Zellen und der daraus resultierenden Raumforderung im konfluenten Zellrasen konnte ein vermehrtes Absterben nicht infizierter Zellen ohne Einleiten der Apoptose durch Zusetzen von Induktoren beobachtet werden [Abb.9 (C)]. Die infizierten BUVEC blieben dagegen intakt und ließen trotz des Stresses, der durch die Größenzunahme des reifenden Schizonten verursacht wurde, dessen weitere Entwicklung zu reifen Schizonten zu [Abb.9 (C-H)]. In manchen Arealen waren dann mit zunehmender Infektionsdauer kaum mehr nicht infizierte Zellen zu finden [Abb.9 (D-E)]. Parallel dazu kultivierte, nicht infizierte Zellrasen blieben dagegen intakt. Mit zunehmender Kulturdauer wuchsen aber in infizierten Zellkulturen nicht infizierte Zellen aus, und es bildeten sich z. T. erneut intakte Zellrasen, in die die ursprünglich schizontentragenden Zellen integriert waren [Abb.9 (D-G)].





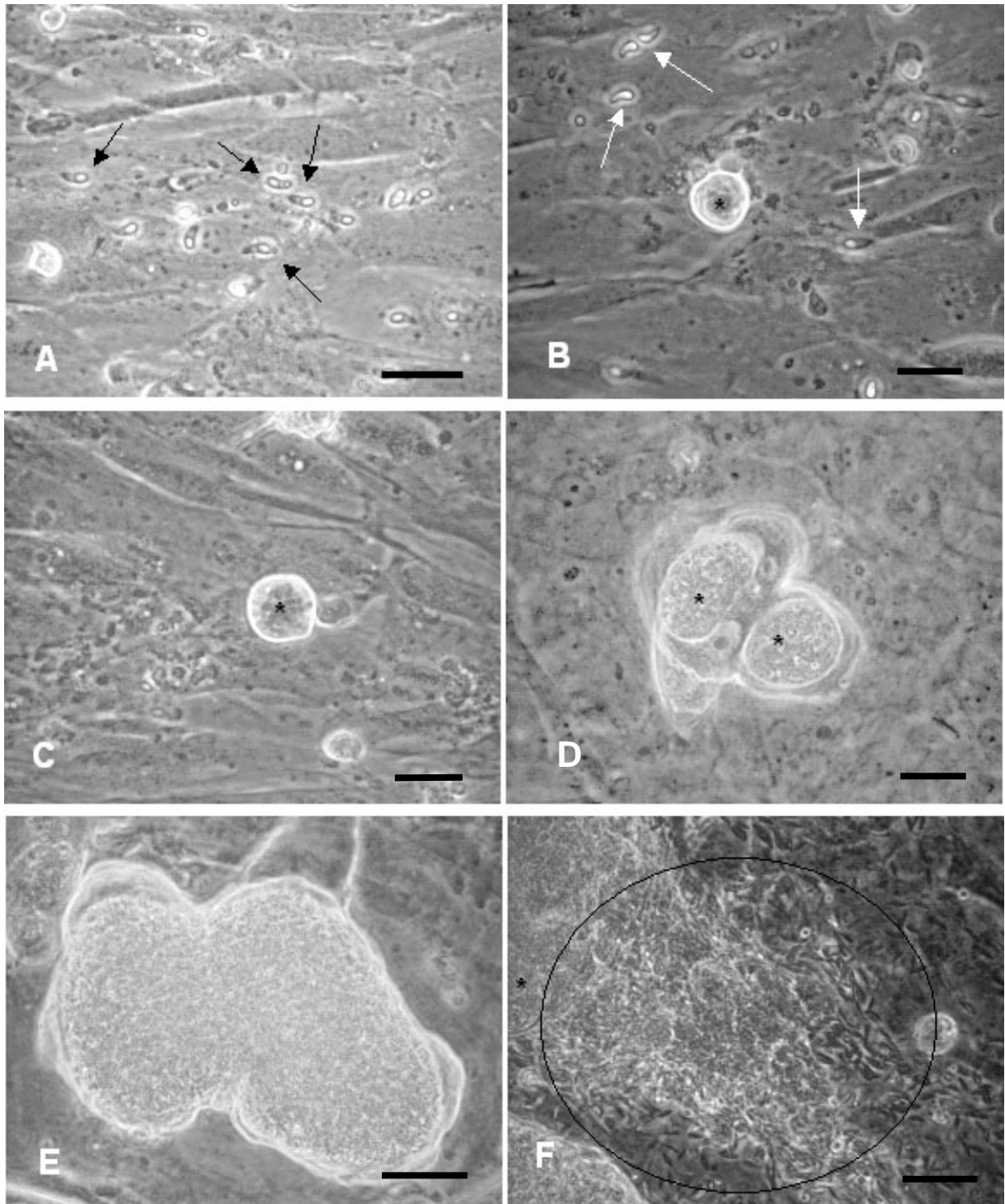
## Abbildung 9

### ***In vitro*-Entwicklung von *E. bovis* in BUVEC und Veränderungen des Wirtszellrasens**

(A) intakter, konfluenter Zellrasen nicht infizierter Zellen (Messbalken 50µm); (B) der gleiche Zellrasen ein Tag nach der Infektion mit  $2,5 \times 10^4$  Sporozoiten/cm<sup>2</sup>. Es kommt zum Teil zu Mehrfachinfektionen (eingegrenzte Bereiche, Messbalken 50µm); (C) infizierte Zellen 18 Tage p. i.; es kommt zum vermehrten Absterben der nicht infizierten Zellen (eingegrenzter Bereich); infizierte Zellen (\*) zeigen zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Expansion durch die Reifung der Schizonten I (Messbalken 80µm); (D) Bildung von Agglomeraten infizierter, schizontentragender Zellen (20 Tage p. i.; Messbalken 80µm); (E) infizierte Zellen zeigen Zytoplasmafortsätze in alle Richtungen, wobei es zum Kontakt zwischen benachbarten Zellen kommt (Messbalken 80µm) (F); um die infizierten, schizontentragenden Zellen (\*) findet ein langsames Auswachsen nicht infizierter Zellen statt; 22 Tage p. i. (Messbalken 80µm); (G) infizierte Zellen finden Kontakt zu weiteren infizierten Zellen und zu proliferierten nicht infizierten Zellen (24 Tage p. i.; Messbalken 80µm); (H) Platzen eines reifen Schizonten mit Freisetzung von Merozoiten (ab Tag 24 p. i.; Messbalken 15µm)

Auch BFGC erlauben eine Entwicklung von *E. bovis*-Sporozoiten zum reifen Schizonten I. Die Entwicklungsschritte bis hin zur Merozoitenfreisetzung liefen in ähnlichen Zeiträumen wie bei BUVEC ab. Nach einer raschen Invasion der Sporozoiten in die Zelle und der Umformung zu Trophozoiten in der parasitophoren Vakuole (PV), konnten ab Tag 5 p. i. erste immature Schizonten beobachtet werden. Allerdings kam es, anders als bei BUVEC, mit deren Auftreten und der sich anschließenden Schizontenreifung zu keiner spontanen Apoptose in nicht infizierten oder infizierten BFGC. Erste reife Schizonten konnten frühestens ab Tag 11-13 p. i. gesehen werden. In der Regel traten sie erst ab Tag 15 p. i. vermehrt auf. Im Vergleich zu BUVEC, deren Schizonten I am Tag 12 eine Größe von 61-88 µm erreichten, erlangten sie bei BFGC eine Größe von 103-130 µm. Am Tag 19 konnte im Falle von BUVEC Größen von 80-92 µm gemessen werden und bei BFGC von 85-250 µm. Ab Tag 17 p. i. kam es in BFGC zur Freisetzung von Merozoiten aus den Schizonten.

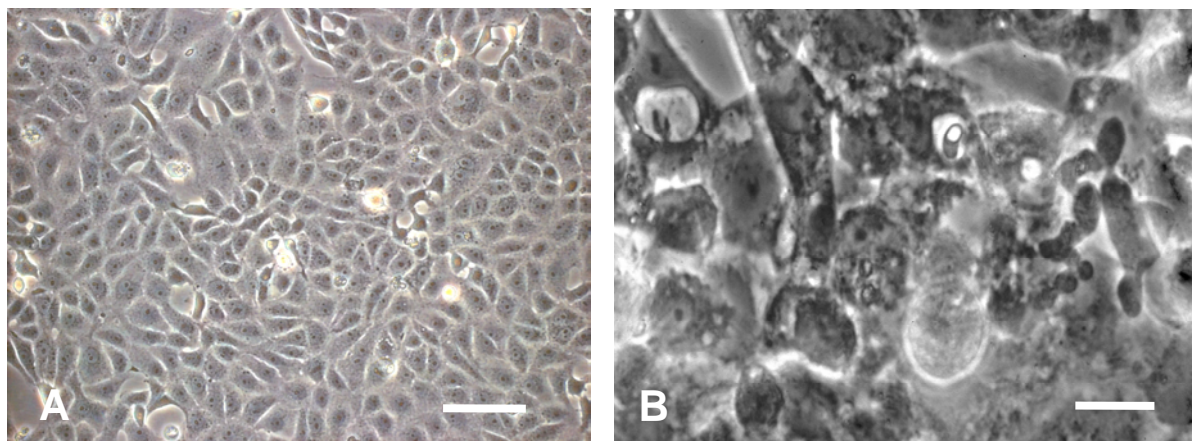
Bei Vero-Zellen kam es nach einer raschen Invasion und einer Umformung der Sporozoiten in eine abgerundete Form zur Ausbildung einer deutlichen PV, in der der Parasit zwar 20 Tage und länger verblieb, sich aber nicht weiter entwickelte. Auch hier kam es zu keinem spontanen Absterben nicht infizierter Zellen.



**Abbildung 10**

***In vitro*-Entwicklung von *E. bovis* in BFGC**

(A) Konfluente Zellrasen 1 Tag p. i. mit intrazellulären Sporozoiten in der PV (Pfeile; Messbalken 30µm). Am Tag 8 p. i. (B) sind neben Sporozoiten (Pfeile) immature Schizonten zu sehen (\*; Messbalken 30µm). Zwischen Tag 10 p. i. (C) (Messbalken 35µm) und Tag 15 p. i. (D) war eine sprunghafte Vergrößerung der Schizonten (\*) zu beobachten (Messbalken 80µm). (E) stellt einen reifen Schizonten am Tag 21 dar (Messbalken 50µm). (F) Freisetzung von Merozoiten (Eingrenzung) aus einem reifen Schizonten (Messbalken 50µm).



**Abbildung 11**

***In vitro*-Entwicklung von *E. bovis* in Vero-Zellen**

(A) Nicht infizierter Vero-Zellrasen (Messbalken 60µm). (B) Infizierter Vero-Zellrasen 10 Tage p. i. mit einem Sporozoiten (Pfeil) in abgerundeter Form in der PV (beide Messbalken 30µm).

Für weitere Versuche wurde von der Verwendung von BUVEC abgesehen, da es sich hierbei um sehr empfindliche Zellen handelt. Die adhärenenten Zellen reagieren schon auf geringfügige Manipulation, wie Mediumwechsel oder Bewegen der Zellkulturflaschen mit spontaner Apoptose. Es war daher nicht möglich, die Wirkung der in der Folge verwendeten Induktoren zu standardisieren. In den anschließenden Untersuchungen wurden daher ausschließlich BFGC und Vero-Zellen verwendet.

#### **4.2 Induktion der Apoptose bei nicht infizierten BFGC und Vero-Zellen**

Als Grundlage für Studien zur Hemmung der Wirtszellapoptose durch *E. bovis* wurde versucht, die Reaktion der als Wirtszellen vorgesehenen BFGC und Vero-Zellen auf Apoptose-Induktoren zu standardisieren. Zur Auslösung der Apoptose wurden drei Apoptoseinduktoren, Actinomycin D, Cytochalasin B und Colchicin, herangezogen.

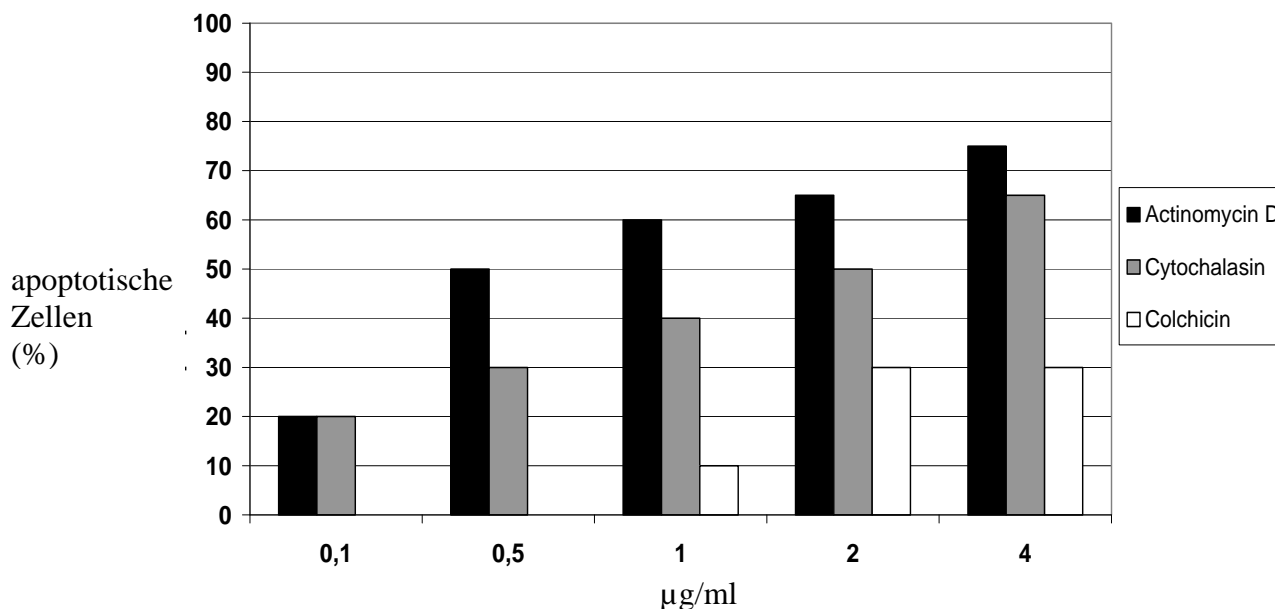
Das Zellgift Actinomycin D, das aus *Streptomyces* sp. gewonnen wird, ist dafür bekannt, dass es die Apoptose über eine Veränderung der Sekundärstruktur der DNA einleitet. Zudem kommt es zur Inhibierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase. Das Gift der Herbstzeitlosen Colchicin und auch Cytochalasin B aus *Helminthosporium dematioides* verhindern die Polymerisation der Mikrotubuli und verursacht so den programmierten Tod der Zelle ein. Im Speziellen verhindert Cytochalasin B die Aktinpolymerisation und lysiert kontraktile Mikrofilamente. Des Weiteren hat dieser Induktor einen negativen Einfluss auf

den Glukosetransport in der Zelle. Colchicin wirkt phasenspezifisch in der M-Phase der Zelle, bindet an Tubulin und verhindert dessen Polymerisation.

Um bei einer ausreichenden Anzahl von Zellen die Apoptose zu induzieren wurden sowohl BFGC als auch Vero-Zellen bis zu einem konfluenten Zellrasen in einer 24-Loch-Platte kultiviert und anschließend in aufsteigenden Konzentrationen mit den entsprechenden Induktoren konfrontiert. Die mikroskopische Beurteilung des Zellrasens (vergleiche Abb. 12 bis Abb. 14) wurde unter Berücksichtigung einer unbehandelten Kontrolle nach 3 h, 5 h, 12 h, 24 h und 48 h vorgenommen. Der Versuch wurde im Doppelansatz geführt und je 3x wiederholt. Ziel der Induktion war eine lichtmikroskopisch erfassbare, morphologische Veränderung von ca. 50 % der Zellen. Dabei handelte es sich um eine Abschätzung der Anzahl apoptotischer Zellen. Es wurden dabei morphologische Veränderungen, wie das Abrunden und Schrumpfen der Zellen sowie das Auftreten zellfreier Areale im Zellrasen, berücksichtigt, die durch das Herauslösen apoptotischer Zellen zustande kamen. Von einer Auszählung der apoptotischen bzw. nicht apoptotischen Zellen musste abgesehen werden, da sich die bei der Apoptose herausgelösten Zellen im Medium des Zellrasens befanden, und keine Unterscheidung zwischen üblicherweise anfallenden Zelltrümmern, apoptotischen Zellen und „apoptotic bodies“ möglich war. Eine Auszählung der verbleibenden, intakten Zellen erwies sich ebenso als nicht umsetzbar, da nicht nur verschiedene Gesichtsfelder, sondern der komplette Zellrasen ausgezählt hätte werden müssen, weil sich das Muster, das sich aus apoptotischen und nicht apoptotischen Zellen ergab, als äußerst unregelmäßig darstellte. Erschwerend kam hinzu, dass die Zellgrenzen der einzelnen Zellen zueinander vor allem bei BFGC sehr undeutlich sind, sodass es nahezu unmöglich war, die einzelnen Zellen voneinander abzugrenzen.

Drei und 5 h nach Induktion der Apoptose mit Actinomycin D, Cytochalasin B und Colchicin konnte durchweg noch keine morphologische Veränderung der Zellen festgestellt werden. Erste mikroskopisch sichtbare Veränderungen traten nach 12 h auf, und nach 24 h und 48 h waren typische Merkmale wie Zellschrumpfung und das Abrunden der Zellen, sowie das Ablösen von Zellen aus ihrem Verband erkennbar (siehe Abb. 15 und Abb. 16). Bei Vero-Zellen waren wesentlich höhere Dosen an Induktoren oder eine längere Inkubationszeit als bei BFGC nötig, um bei annähernd gleich vielen Zellen die Apoptose zu provozieren. Um mit 0,5 µg/ml Actinomycin D bei der Hälfte der Zellen eines Zellrasens die Apoptose einzuleiten wurde für BFGZ eine Inkubationszeit von 24 h benötigt, bei Vero-Zellen von 48 h. Bei gleicher Inkubationszeit von 48 h wurde für Vero-Zellen im Vergleich zu BFGZ eine achtfache Konzentration von Cytochalasin B benötigt, um eine 50 %ige Apoptoserate zu

erlangen. Für Colchicin wurde bei gleicher Inkubationszeit für Vero-Zellen eine 3,5-mal höhere Konzentration gebraucht als für BFGC (siehe Tabelle 6).



**Abbildung 12**

**Anteil apoptotischer BFGC 24 h nach Apoptoseinduktion mit Actinomycin D, Cytochalasin B und Colchicin**

Nach einer Inkubation von 24 h zeigte sich für Actinomycin D eine Apoptoserate von 50 % bei einer Konzentration von 0,5 µl/ml. Cytochalasin B-induzierte BFGC benötigten für eine 50 %ige Apoptoserate eine Konzentration von 2 µl/ml. Die Inkubationszeit von 24 h reichte für den Induktor Colchicin nicht aus, um eine ausreichende Apoptose zu induzieren.

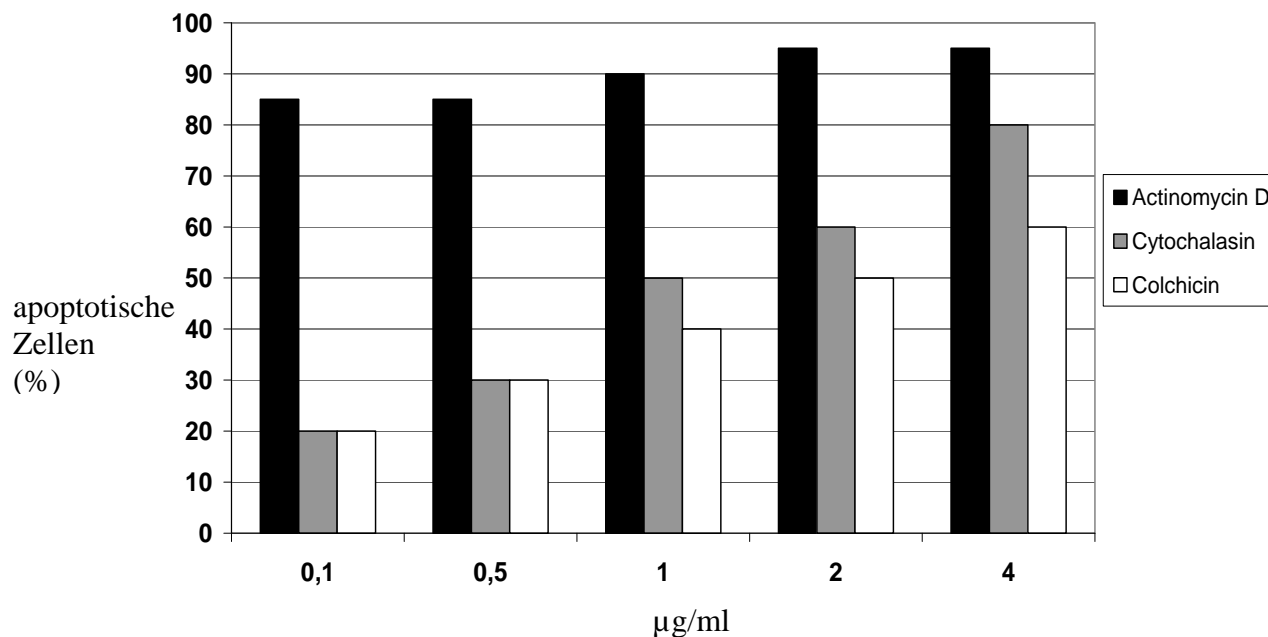
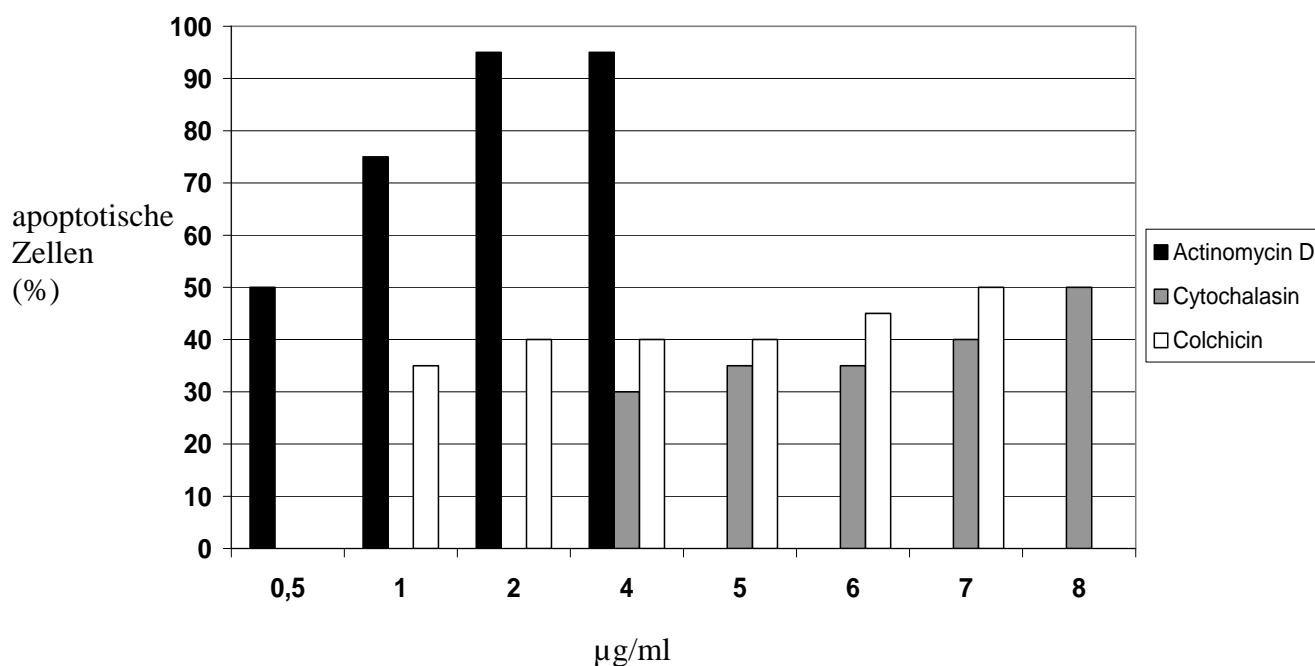


Abbildung 13

#### Anteil apoptotischer BFGC 48h nach Apoptoseinduktion mit Actinomycin D, Cytochalasin B und Colchicin

Bei einer Inkubationszeit von 48 h genügten für den Induktor Cytochalasin B 1 µg/ml und für Colchicin 2 µg/ml, um eine 50 %ige Apoptoserate zu erlangen. Auch die niedrigste eingesetzte Konzentration von 0,1 µg/ml verursachte bei dem Induktor Actinomycin D nach einer Inkubationszeit von 48 h eine Apoptoserate von über 80 %.



**Abbildung 14****Anteil apoptotischer Vero-Zellen 48 h nach Apoptoseinduktion mit Actinomycin D, Cytochalasin B und Colchicin**

Actinomycin D-induzierte Vero-Zellen zeigten schon bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml eine Apoptoserate von 50 %. Vergleichbare Ergebnisse traten bei Cytochalasin B bei einer Konzentration von 8 µg/ml und bei Colchicin von 7 µg/ml auf.

Basierend auf den obigen Ergebnissen wurden für weitere Versuche die in Tabelle 6 angegebenen Induktor-Konzentrationen und Inkubationszeiten festgelegt.

**Tabelle 6****Verwendete Inkubationszeiten und Konzentrationen der Apoptose-Induktoren für BFGC und Vero-Zellen**

	<b>BFGC</b>	
	24 h Inkubationszeit	48 h Inkubationszeit
Actinomycin D	0,5 µg/ml	**
Cytochalasin B	2 µg/ml	1 µg/ml
Colchicin	*	2 µg/ml

	<b>Vero-Zellen</b>	
	24 h Inkubationszeit	48 h Inkubationszeit
Actinomycin D	*	0,5 µg/ml
Cytochalasin B	*	8 µg/ml
Colchicin	*	7 µg/ml

\* kein ausreichender Effekt bei verwendeten Induktorkonzentrationen nach einer Inkubationszeit von 24 h zu erkennen

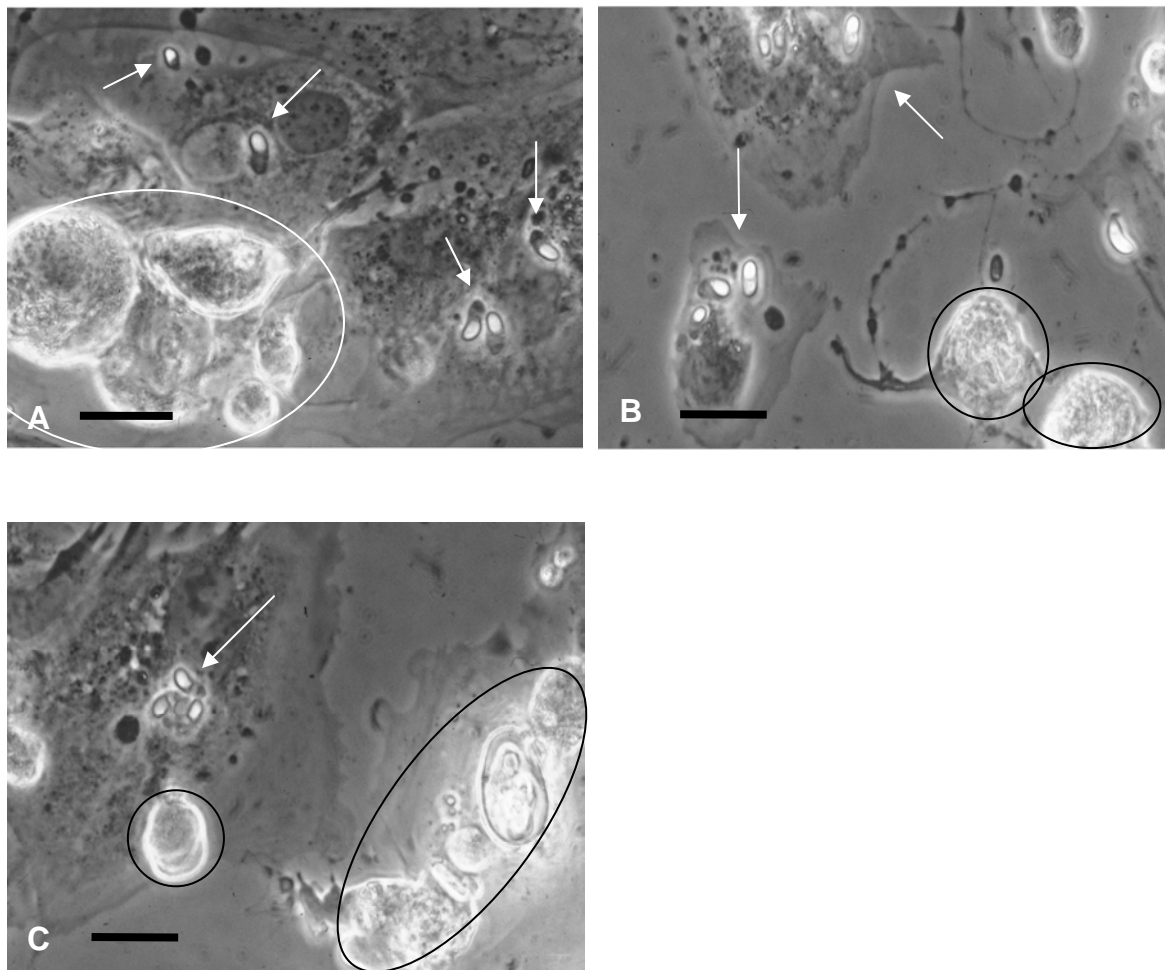
\*\* Apoptoserate über 80 % bei niedrigster Konzentration von 0,1 µg/ml Actinomycin D nach 48 h



### 4.3 Einfluss von *E. bovis* auf die Apoptosefähigkeit von BFGZ und Vero-Zellen

Um den Einfluss von *E. bovis* auf die Apoptosefähigkeit der Wirtszelle auf lichtmikroskopischer Ebene zu überprüfen, wurden infizierte BFGC und Vero-Zellen den Apoptoseinduktoren an den Tagen 1, 2, 3, 5, 7 und 10 p. i. ausgesetzt (siehe Tabelle 6).

Die Behandlung am 1. Tag p. i. führte bei beiden Zelllinien zum Egress nahezu aller Sporozoiten aus den Wirtszellen. In der Folge kam es zur Apoptose der Zellen, wobei kein Unterschied zwischen ehemals infizierten und nicht infizierten Zellrasen bestand. Am 2. Tag p. i. kam es durch die Behandlung nur noch vereinzelt zum Egress der Parasiten. Die Apoptoseraten lagen unabhängig von Induktoren und infizierten und nicht infizierten Zellrasen bei ca. 50 %, doch zeigte sich, dass infizierte Zellen nicht apoptotisch wurden. Bei nicht infizierten Zellen beider Zelllinien waren dagegen nach der entsprechenden Inkubationszeit der Induktoren typische Anzeichen wie das Abrunden der Zelle, Zellschrumpfung und Herauslösen der Zellen aus dem Zellverband zu sehen (Abb. 15 und Abb. 16). Die morphologischen Zeichen der Apoptose stellten sich unabhängig von den verwendeten Induktoren gleich dar. Auch bestand kein Unterschied zwischen den Zellrasen, die 3, 5, 7 oder 10 Tage p. i. induziert wurden. Beispielhaft werden in Abb. 15 (A-C) BFGC dargestellt, die an unterschiedlichen Tagen p. i. behandelt wurden. Die Abrundung der apoptotischen, nicht infizierten Zellen (Abb. 15 umgrenzte Bereiche), deren Zellschrumpfung und Herauslösen aus dem Zellverband sind zu erkennen. Im Gegensatz dazu wiesen infizierte BFGC [Abb. 15 (A-C) Pfeile] keines dieser Anzeichen auf. Ebenso verhielt es sich bei Vero-Zellen, die in Abb. 16 (A-C) dargestellt sind. Die Pfeile markieren infizierte, intakte Zellen mit deutlicher PV. Auch bei Vero-Zellen waren Abrundung und Zellschrumpfung zu beobachten [Abb. 16 (A-C)]. In Folge der Apoptose waren auch zellfreie Areale zu sehen [Abb. 16 (B)].



**Abbildung 15**

***E. bovis* infizierter BFGC-Zellrasen nach Applikation von Apoptoseinduktoren 3 und 5 Tage p. i.**

(**A**) mit Actinomycin D induzierte Apoptose (3 Tage p. i.). Die Pfeile markieren intrazellulär liegende Sporozoiten in intakten BFGC. Gut erkennbar ist das stark reflektierende Refraktilkörperchen der Sporozoiten. Im umgrenzten Areal sind abgerundete, z. T. herausgelöste, apoptotische Zellen zu erkennen; (**B**) mit Cytochalasin B induzierte Apoptose (5 Tage p. i.). Einzeln liegende, mehrfach infizierte Zellen (Pfeile) mit daneben liegenden apoptotischen, nicht infizierten Zellen (Umgrenzungen); (**C**) mit Colchicin induzierte Apoptose (3 Tage p. i.). Mehrfachinfektion einer intakten Zelle (Pfeil). Daneben lösen sich mehrere, nicht infizierte, apoptotische BFGC aus dem Zellrasen (Umgrenzung) (alle Messbalken 20 µm)

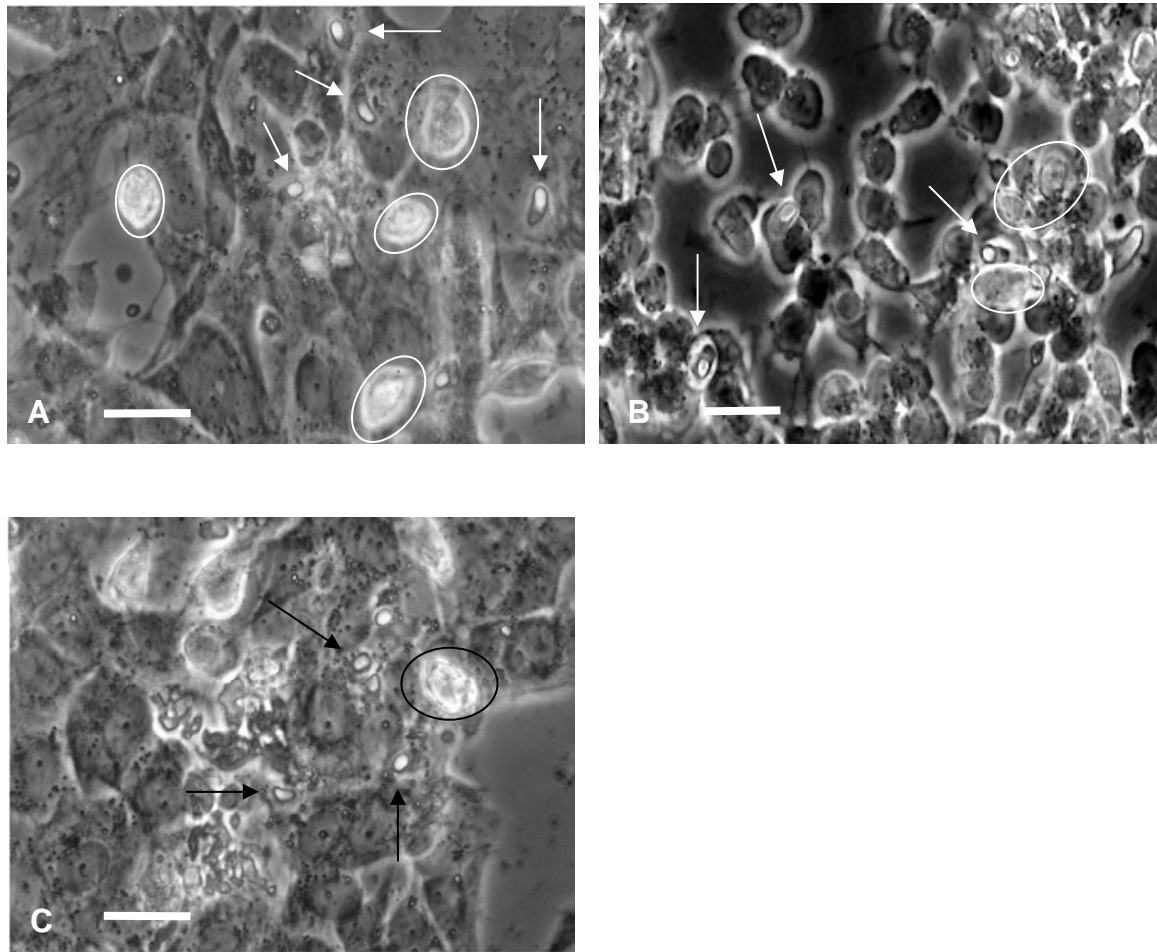


Abbildung 16

***E. bovis* infizierter Vero-Zellrasen nach Applikation von Apoptoseinduktoren 3, 5 und 7 Tage p. i.**

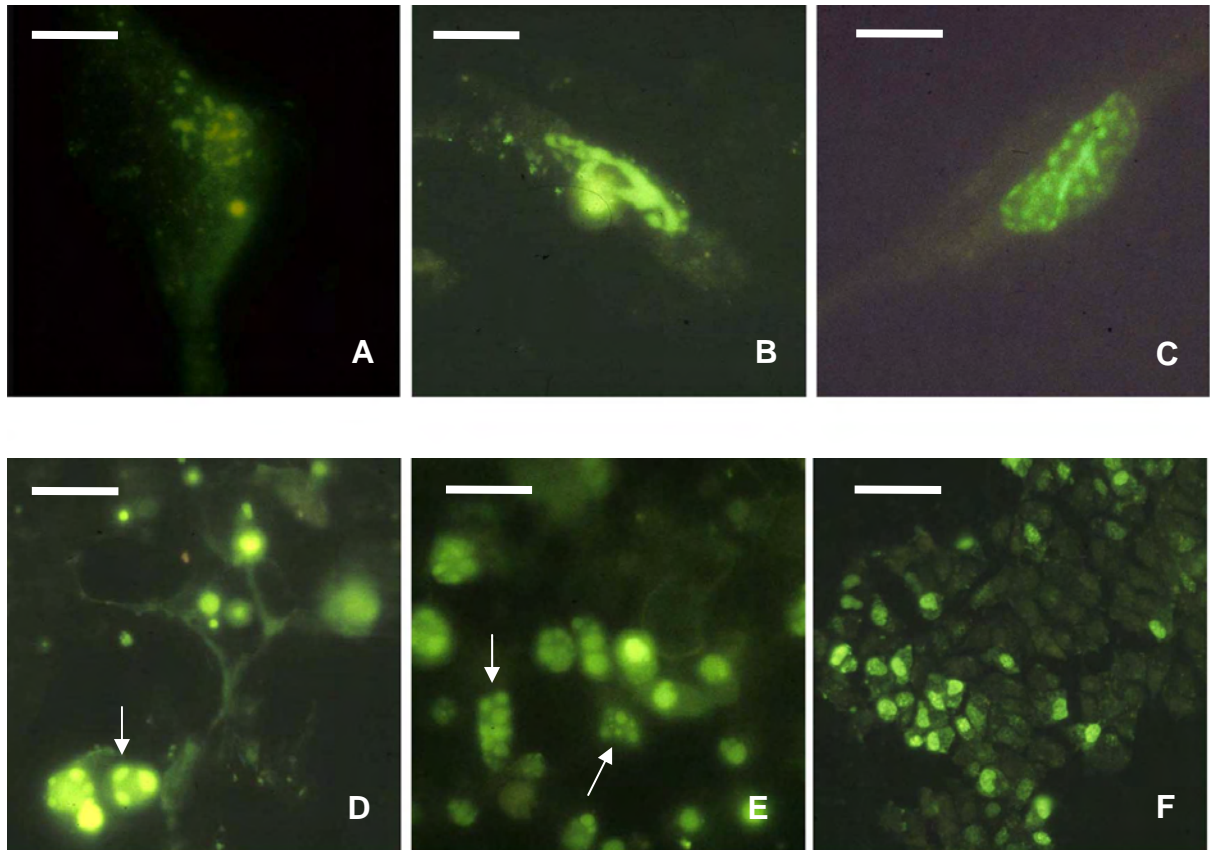
Mit *E. bovis* (Pfeile) infizierte Vero-Zellen mit deutlichen PV. Daneben sind, in durch den Zelltod lückenhaft gewordenen Zellrasen, reflektierende, abgerundete, apoptotische Zellen zu erkennen [(A)-(C) Umgrenzungen]. (A) 5 Tage p. i. mit Actinomycin D induzierte Apoptose. Intrazellulär liegende Sporozoiten in intakten Vero-Zellen (Pfeile). Die umgrenzten, nicht infizierten Zellen sind abgerundet und zum Teil aus dem Zellverband herausgelöst. (Messbalken 20µm); (B) Mit Cytochalasin B induzierte Apoptose (3 Tage p. i.). In den infizierten Vero-Zellen ist je eine PV um die Sporozoiten erkennbar (Pfeile). Es bilden sich zellfreie Areale durch herausgelöste, apoptotische Zellen (Umgrenzung; Messbalken 30µm); (C) Mit Colchicin induzierte Apoptose (7 Tage p. i.). Auch hier runden sich apoptotische, nicht infizierte Zellen ab und es zeigen sich zellfreie Areale. Die Sporozoiten (Pfeile) liegen in nicht apoptotischen Zellen (Messbalken 25µm).

#### 4.4 Nachweis der Apoptoseinhibition durch *E. bovis*-Sporozoiten mittels TUNEL-

##### Assay

DNA Fragmente, die während der Apoptose auftreten, werden im TUNEL-Assay anhand ihrer freien 3'-OH-Enden nachgewiesen. Mittels dieses Verfahrens sind apoptotische Zellen in der Spätphase der Apoptose, sowie ihre „apoptotic bodies“ über eine grüne Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 17). Nicht apoptotische Zellen zeigen eine leichte, grüne Eigenfluoreszenz. Sporozoiten fluoreszieren in diesem Assay ohne zusätzliche Färbung gelb bis orange.

Es wurden infizierte induzierte und nicht infizierte induzierte Zellrasen beider Zelllinien untersucht. Als Kontrolle dienten nicht infizierte, nicht induzierte Zellrasen. Nicht infizierte induzierte Zellen beider Zelllinien zeichneten sich durch eine starke Grünfluoreszenz aus (Abb. 17). Sowohl in BFGC [Abb. 17 (C)], als auch in Vero-Zellen [Abb. 17 (D) und (E) Pfeile] konnte deutliches „membrane blebbing“ dargestellt werden. Ebenso zeigten sich stark grün fluoreszierende, rundliche Fragmente, die sog. „apoptotic bodies“, die sich bereits von den Zellen abgeschnürt hatten [Abb. 17 (A), (B) und (D)]. In infizierten Zellrasen beider Zelllinien stellten sich schemenhaft fluoreszierende Zellen dar, deren Zellränder kaum zu erkennen waren [Abb. 18 (A-F)]. In diesen Zellen zeigten sich die Sporozoiten als orangeleuchtende, längliche Strukturen. Die offensichtlich infizierten Zellen gaben keinen Hinweis auf eine Spätapoptose. Neben diesen Zellen konnten stark grün fluoreszierende „apoptotic bodies“ [Abb. 18 (D) eingegrenzt] und Zellen mit „membrane blebbing“ dargestellt werden [Abb. 18 (C) eingegrenzt], die keine Sporozoiten enthielten. Dies galt sowohl für BFGC [Abb. 18 (A-C)], als auch für Vero-Zellen [Abb. 18 (D-F)]. Die beobachteten Effekte ließen sich mit allen Induktoren hervorrufen und waren unabhängig vom Zeitpunkt p. i.



**Abbildung 17**

**Apoptotische BFGC und Vero-Zellen im TUNEL Assay**

(A-C) nicht infizierte BFGC sowie nicht infizierte Vero-Zellen (D-F) nach Induktion der Apoptose. (A) Mit Actinomycin D induzierte Apoptose in BFGC. Starke Grünfluoreszenz als Zeichen der Spätapoptose (Messbalken 20µm). (B) Stark fluoreszierende, mit Cytochalasin B induzierte BFGC zeigten ein ähnliches Bild wie BFGC in (A) (Messbalken 20µm). (C) „Membrane blebbing“ in BFGC (Induktor: Colchicin; Messbalken 20µm). Mit Actinomycin D (D) und mit Cytochalasin B (E) induzierte Apoptose in Vero-Zellen stellte sich in Form von kompakten, stark fluoreszierenden, abgerundeten Zellen dar. Auch hier war „membrane blebbing“ (Pfeile) an der Zelloberfläche zu erkennen (beide Messbalken 20µm). Bei einer Überblicksvergrößerung ließ sich in Bild (F) ein klarer Unterschied zwischen den schwach fluoreszierenden, schemenhaften, nicht apoptotischen und den stark fluoreszierenden apoptotischen Zellen erkennen. Hierbei zeigte sich, dass sich, wie unter 3.2. beschrieben, Felder intakter Zellen mit Feldern heraus gelöster und apoptotischer Zellen abwechseln (Messbalken 40µm).

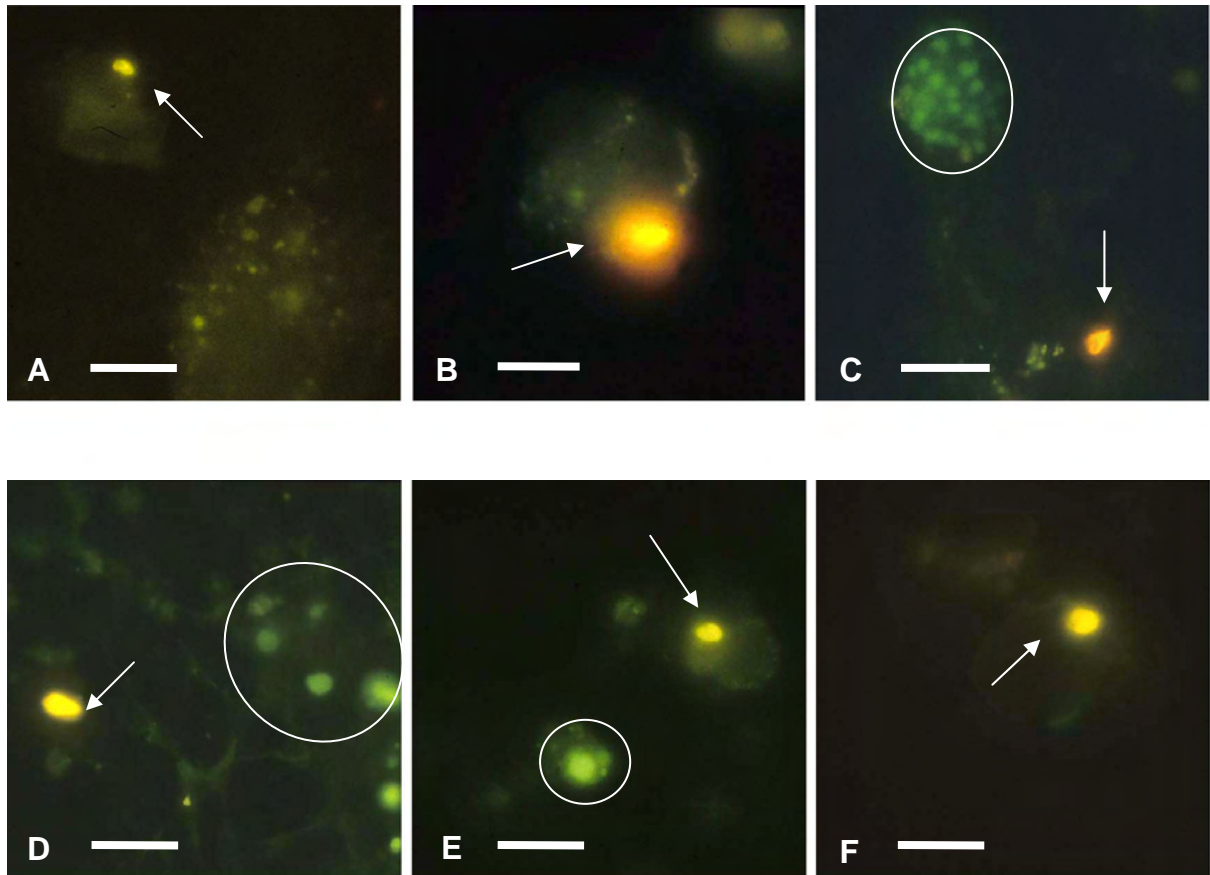


Abbildung 18

#### Nachweis der Apoptoseinhibition durch Sporozoiten im TUNEL Assay in BFGC und Vero-Zellen

(A-C) infizierte BFGC und (D-F) infizierte Vero-Zellen nach Induktion der Apoptose. (A) Mit Actinomycin D induzierte Apoptose in BFGC (5 Tage p. i.). Schwach fluoreszierende Zelle mit schemenhaften Zellgrenzen und orange-fluoreszierendem, quer getroffenen Sporozoiten (Pfeil). (B) Mit Cytochalasin B induzierte Apoptose in BFGC (5 Tage p. i.). Stark fluoreszierender Sporozoit (Pfeil); kaum erkennbare Zellgrenzen der Wirtszelle. (C) Mit Colchicin induzierte Apoptose in BFGC (7 Tage p. i.). Grün fluoreszierende Zelle mit „membrane blebbing“ (eingegrenzt) neben einer infizierten Zelle (Pfeil). (D) Mit Actinomycin D induzierte Apoptose in Vero-Zellen. Neben der infizierten Zelle mit undeutlichen Zellrändern (Pfeil) stellten sich nicht infizierte, grün fluoreszierende apoptotische Zellen und deren „apoptotic bodies“ dar (Kreis). (E) Bei mit Cytochalasin B induzierter Apoptose in Vero-Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild wie in (D). (F) Mit Colchicin induzierte Apoptose in Vero-Zellen. Infizierte Vero-Zelle (Pfeil) ohne Anzeichen der Spätapoptose (alle Messbalken 20 µm).

#### 4.5 Versuch der Quantifizierung der Apoptose anhand der Annexin V-Expression

Während der Apoptose werden Phosphatidylserine von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite verlagert. Annexin V bindet an die Phosphatidylserine und kann daher zur Markierung apoptotischer Zellen eingesetzt werden. Das Verfahren erlaubt eine Quantifizierung der Frühapoptose per Durchflusszytometrie. Allerdings traten bei dieser Nachweismethode für das hier verwendete Zellmaterial in der Praxis diverse Probleme auf:

In Vorversuchen wurde zunächst ein selbst hergestellter Bindungspuffer „AnnexinV-PE“ verwendet. Bei der anschließenden Analyse waren bis auf die unbehandelte Kontrolle sowohl infizierte, als auch nicht infizierte Zellen beider Zellreihen zu 85 % - 95 % AnnexinV- positiv. Um möglichst jeden Zellstress zu vermeiden, der zur Einleitung der Apoptose führen könnte, wurde zunächst das Ablösen der adhärennten Zellen verändert. Statt der üblichen Trypsinierung der Zellen, bei der die Adhäsionsmoleküle der Zellen gespalten werden, wurde auf die Verwendung von Acutase zurückgegriffen. Bei dieser Methode bleiben die Oberflächenmoleküle der Zellmembran laut Hersteller vollständig in ihrer Funktion und Qualität intakt. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie blieben jedoch gleich. In der Folge wurden unterschiedliche Inkubationszeiten der Apoptoseinduktoren getestet um abzuschätzen, ab welchem Zeitpunkt nach der Induktion Phosphatidylserine evertiert werden. Innerhalb der Inkubationszeiten von 5 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h ergaben sich keine Unterschiede in der Rate Annexin V-positiver Zellen. Um eine unspezifische Antikörperbindung auszuschließen, wurde alternativ ein anderes Annexin V-Konjugat verwendet (Annexin V Alexa Fluor 488, Molecular Probes anstatt Annexin V-PE, Caltac Laboratories). Die Ergebnisse blieben jedoch gleich.

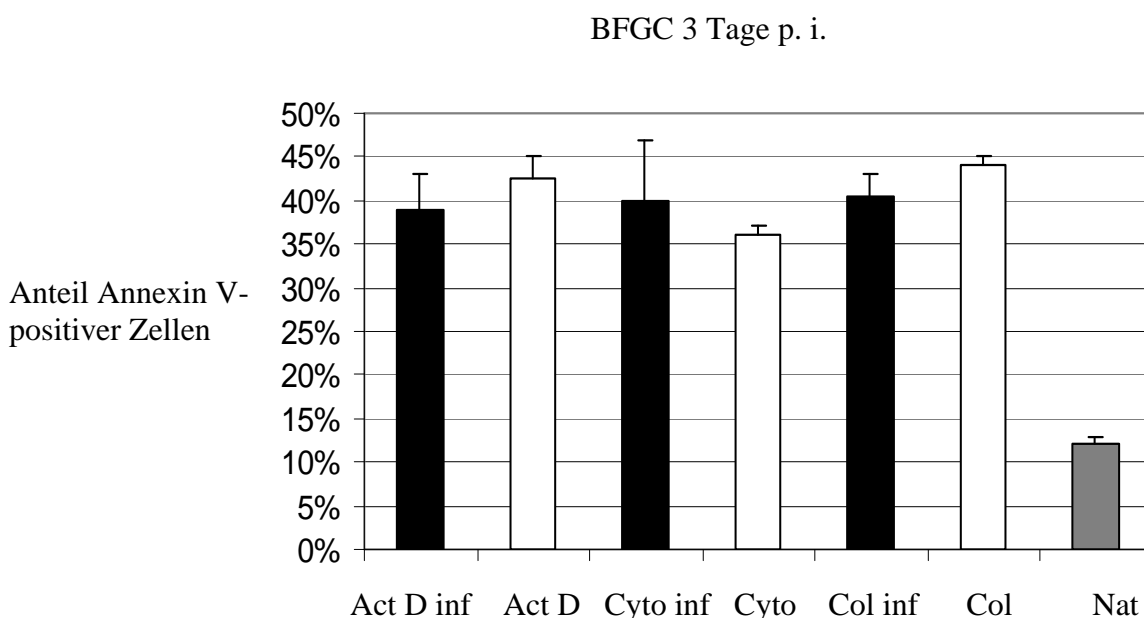
Da auch nicht infizierte, nicht induzierte Zellen regelmäßig Annexin V-positiv waren, wurde bei diesen Zellen eine vital-Färbung mit Trypanblau durchgeführt, um auszuschließen, dass der Ablöse- und Färbvorgang die Apoptose auslöst. Die Rate toter Zellen nach Trypsinierung lag bei Vero-Zellen bei 0 % und bei BFGC bei 20 %. Vero-Zellen, die nach dem Trypsinieren für 4 h auf Eis gekühlt wurden zeigten eine Vitalität von 92 %, BFGC von 82 %. Nach einer Färbung mit AnnexinV waren 92 % der Vero-Zellen und 77 % der BFGC noch vital.

Des Weiteren wurde eine Färbung mit Trypanblau nach der Induktion der Apoptose mit Actinomycin D, Cytochalasin B und Colchicin in Vero-Zellen durchgeführt. Es fand eine Färbung und Auszählung der Zellen 14 h, 24 h und 48 h post inductionem statt. 14 h nach der Apoptoseinduktion waren für Actinomycin D 13%, für Cytochalasin B 13,5% und für Colchicin 9% der Zellen Trypanblau-positiv. Nach 24 h erhöhte sich der Prozentsatz Trypanblau-positiver Vero-Zellen für Cytochalasin B auf 23% und für Colchicin auf 19%. Für

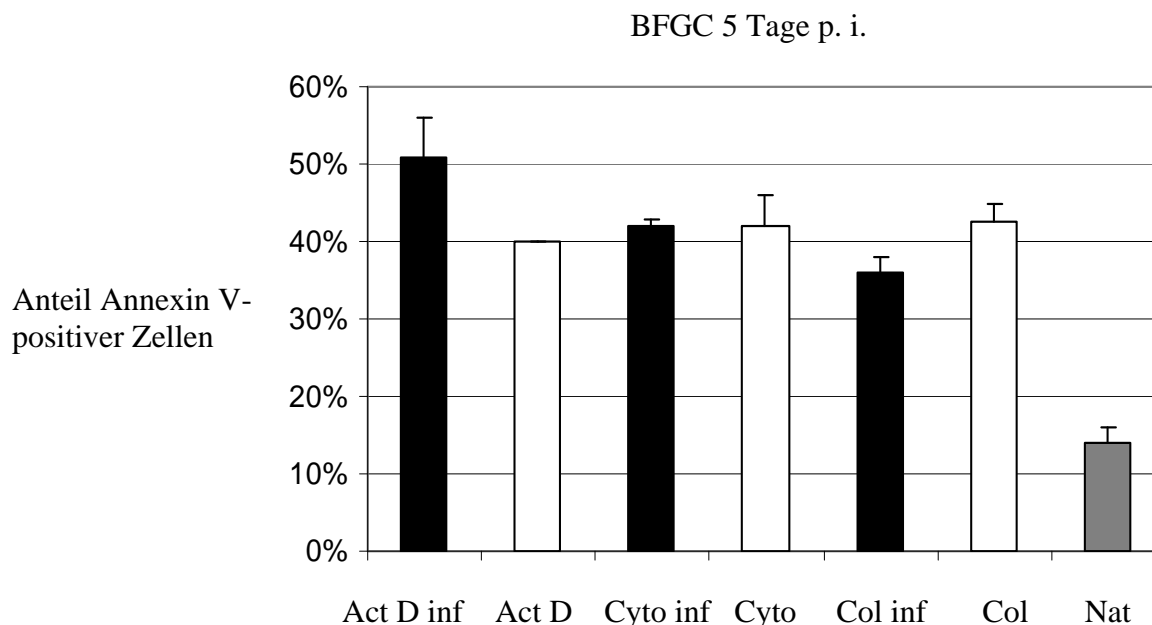
Actinomycin D blieb die Rate positiver Zellen nach 24 h gleich. 48 h nach der Induktion zeigten 34% Actinomycin D induzierter Zellen eine Trypanblau-Färbung, 38% der Cytochalasin B-induzierten Zellen und 39% der Colchicin-induzierten Zellen.

Gemäß der Kontrollversuche musste daher von einem falsch positiven Ergebnis der Durchflusszytometrie ausgegangen werden. Erst ein Wechsel der Reagenzien, d.h. die Verwendung des Annexin V, FITC Apoptosis Detection Kit I<sup>®</sup> (BD Pharmingen) erbrachte eine realistische, reproduzierbare Rate apoptotischer Zellen von 50 bis 60% bei induzierten Zellen.

Die Anteile markierter infizierter induzierter und nicht infizierter, induzierter Zellen wurden sowohl im Durchflusszytometer bestimmt als auch unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Bei der Auszählung wurde die Gesamtzahl der Zellen, durchschnittlich 180 Einzelzellen pro Ansatz, mittels eines Invertmikroskops erfasst. Anschließend wurde der Anteil Annexin V-positiver Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt und der prozentuale Anteil errechnet. Der Versuch wurde pro Zelllinie für Tag 3 und Tag 5 p. i. einmal wiederholt. Da sich für Vero-Zellen ähnliche Ergebnisse ergaben, werden hier beispielhaft die Zählungen von BFGC gezeigt.





**Abbildung 19****Prozentualer Anteil Annexin V-positiver BFGC nach Infektion mit *E. bovis* Sporozoiten**

3 Tage p. i.: Die nicht infizierte, nicht induzierte Kontrolle (Nat) zeigte einen geringen Anteil von 12 % Annexin V-positiver Zellen. Der Anteil Annexin V-positiver BFGC war in infizierten und nicht infizierten induzierten Ansätzen ähnlich hoch. 5 Tage p. i.: Die Ergebnisse entsprachen denen von 3 Tagen p. i.

Act D inf = infiziert, mit Actinomycin D induzierte BFGC

Act D = nicht infiziert, mit Actinomycin D induzierte BFGC

Cyto inf = infiziert, mit Cytochalasin B induzierte BFGC

Cyto = nicht infiziert, mit Cytochalasin B induzierte BFGC

Col inf = infiziert, mit Colchicin induzierte BFGC

Col = nicht infiziert, mit Colchicin induzierte BFGC

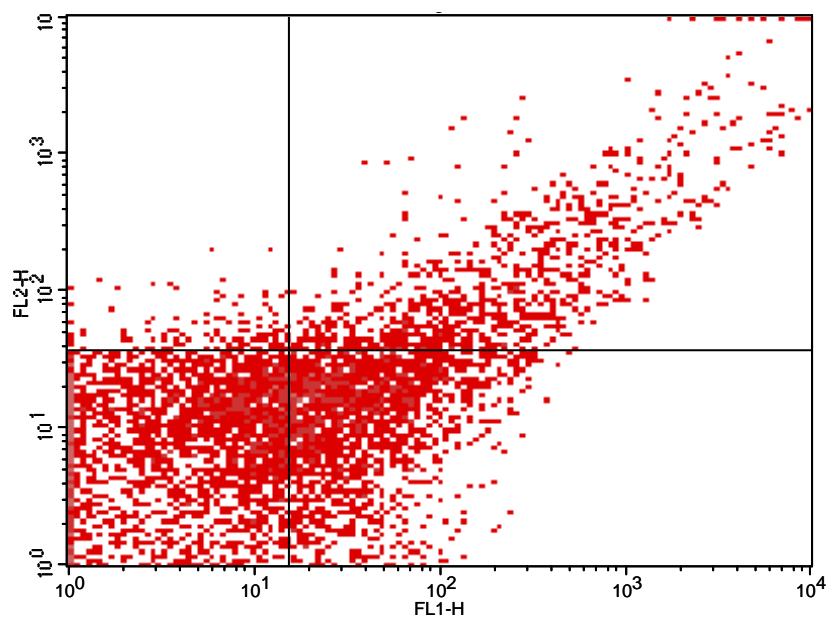
Die durchflusszytometrischen Messungen zeigten ein vergleichbares Ergebnis zu den Auszählungen. In Abbildung 20 werden beispielhaft die Ergebnisse infizierter (A) und nicht infizierter (B) BFGC gezeigt, die mit Colchicin behandelt wurden. Die Zellen wurden sowohl mit Annexin V zum Nachweis der Apoptose, als auch mit Propidium Iodid (PI) zum Nachweis der Nekrose markiert.

Abbildung 20 zeigt keine augenfälligen Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten BFGC. Der Bereich unten links beinhaltet Annexin V- und PI-negative Zellen, die bei infizierten Zellen (A) 43 % und bei nicht infizierten Zellen (B) 49 % ausmachten. Rechts unten befinden sich 28 % Annexin V-positive (apoptotische), infizierte BFGZ (A) und 32 % Annexin V-positive, nicht infizierte BFGZ (B). Im Bereich oben rechts sind PI-positive

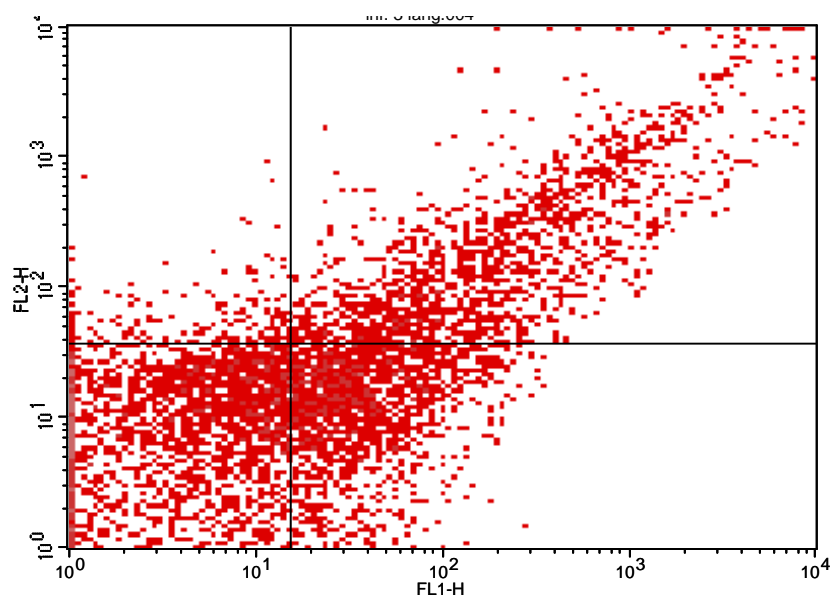
Zellen, die als nekrotische Zellen, aber aufgrund ihrer Größe und Form (kleine, abgerundete Zellen und „apoptotic bodies“) zum Teil auch als spätapoptotische Zellen angesprochen werden müssen. Der prozentuale Anteil der Zellen aus infizierten (A) und nicht infizierten (B) Zellrasen beträgt 26% bzw. 17%. Oben links sind die PI-positive, nekrotischen Zellen mit 4 % (A) bzw. 2,5 % (B) aufgeführt. In weiteren Messungen zeigte sich zum Teil ein ähnliches oder ein umgekehrtes Bild der prozentualen Anteile der einzelnen Bereiche.

**A**

Infizierte mit Colchicin behandelte BFGC 3 Tage p. i.

**B**

Nicht infizierte, mit Colchicin behandelte BFGC

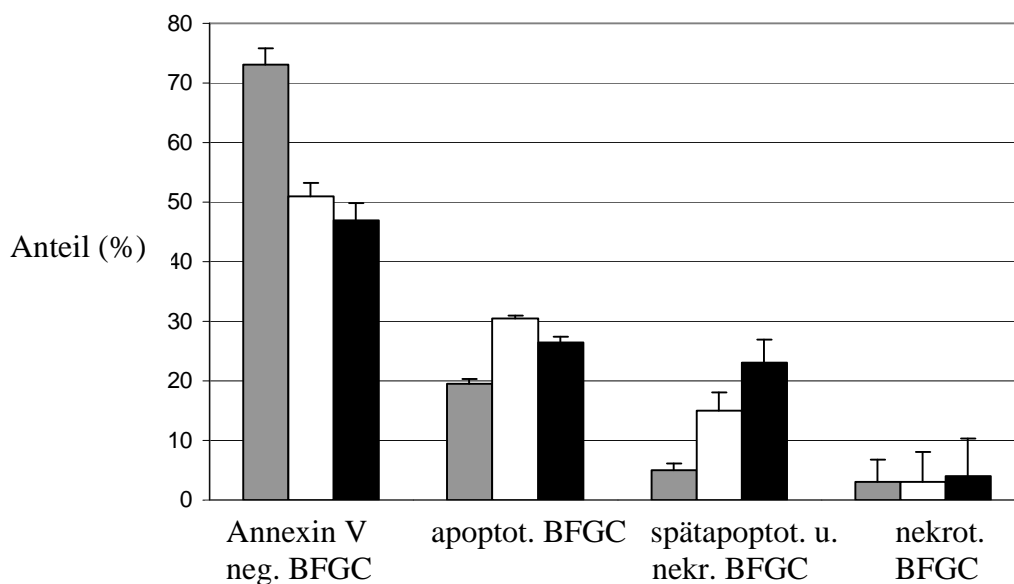


**Abbildung 20****Durchflusszytometrisches Diagramm Annexin V-markierter BFGC**

(A) infizierte, Colchicin-induzierte (B) nicht infizierte, Colchicin induzierte BFGC.

Die durchflusszytometrischen Messungen ergaben nur geringfügige Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten BFGC. Quadrant unten links: Annexin V- und PI-negative Zellen; oben links: PI-positive, nekrotische Zellen; unten rechts: Annexin V-positive, apoptotische Zellen; oben rechts: nekrotische und spätapoptotische BFGC.

Die oben dargestellten Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung wiederholten sich mit geringfügigen Abweichungen bei weiteren Ansätzen. Abb. 21 zeigt die Auswertung eines weiteren Ansatzes am Beispiel der Induktors Colchicin.

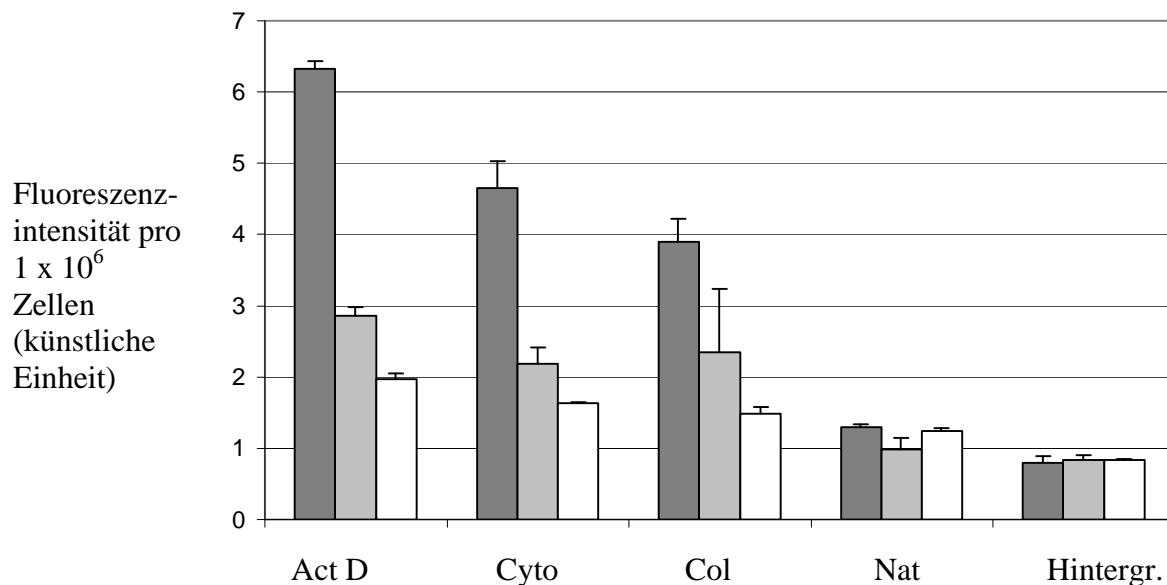
**Abbildung 21****Erfassung Annexin V-positiver BFGC nach Behandlung mit Colchicin 3 Tage p. i.**

*E. bovis* infizierter (3 Tage p. i.) und nicht infizierter, mit Colchicin behandelter Zellrasen. (grau = nicht infizierte, nicht induzierte Zellen; weiß = nicht infizierte, mit Colchicin behandelte Zellen; schwarz = *E. bovis* infizierte mit Colchicin behandelte Zellen).

#### **4.6 Versuch der Quantifizierung der Apoptose anhand der Caspase 3-Aktivierung mittels Fluoroscans**

Wird in einer Zelle die Apoptose eingeleitet, mündet diese bei jedem der drei Wege in die Aktivierung der Caspase 3, die die übergeordnete Effektorcaspase darstellt. Von ihr ausgehend werden weitere Effektorcaspasen aktiviert, sodass ihre Aktivität als Voraussetzung für alle weiteren zellphysiologischen Vorgänge während des programmierten Zelltodes gilt. Der Caspase 3-Nachweis ist somit eine weitere Möglichkeit, die Frühapoptose zu erkennen. Die Aktivierung dieser Caspase ist zeitlich noch vor der Eversion der Phosphatidylserine anzusiedeln.

Das hier verwendete, kommerzielle Kit erfasst die aktive Caspase 3 quantitativ, da die Menge der aktiven Caspase 3 mit der Intensität der emittierten Fluoreszenz korreliert. Es wurden BFGC und Vero-Zellen aus nicht infizierten induzierten Zellrasen mit BFGC und Vero-Zellen aus infizierten induzierten Zellrasen verglichen. Als Negativkontrolle wurden jeweils Zellen aus nicht infizierten, nicht induzierten Zellrasen genutzt. Zumal in infizierten und nicht infizierten Proben durch die Induktion der Apoptose aktive Caspase 3 zu erwarten war, sollten eventuelle Unterschiede bei den zu vergleichenden Proben anhand der Fluoreszenzintensität erfasst werden. Da der Zeitpunkt der Aktivierung von Caspase 3 sowohl von der individuellen Empfindlichkeit einzelner Zellreihen auf die jeweiligen Induktoren, als auch von den gewählten Induktoren selbst abhängig ist, wurden Vorversuche mit nicht infizierten Zellen durchgeführt, bei denen nach 5 h, 12 h und 24 h Inkubationszeit die Fluoreszenzintensitäten gemessen wurden. Die Messungen wurden mit einem Fluoroscans bei einer Exzitation/Emission von 496/ 520 nm durchgeführt. Dabei erwies sich für BFGC und Vero-Zellen eine Inkubationszeit der Induktoren von 5h als günstig (Abb. 22). Die Fluoreszenzintensität von nicht induzierten Zellen blieb erwartungsgemäß bei unterschiedlichen Inkubationszeiten annähernd gleich. Für alle drei Induktoren konnte jedoch bei einer Inkubationszeit von 5 h, im Vergleich mit den längeren Inkubationszeiten von 12 und 24 h, ein Anstieg der Fluoreszenzintensität verzeichnet werden (Abb. 22). Für weitere Experimente zur Caspase 3-Bestimmung wurde in der Folge eine Inkubationszeit von 5 h verwendet.

**Abbildung 22****Vorversuche zum Caspase-3-Nachweis mit BFGC**

Dunkelgrau: Fluoreszenzintensität 5 h nach Apoptoseinduktion

Hellgrau: Fluoreszenzintensität 12 h nach Apoptosinduktion

Weiß: Fluoreszenzintensität 24 h p. i.

Act D inf = infiziert, mit Actinomycin D induzierte BFGC

Act D = nicht infiziert, mit Actinomycin D induzierte BFGC

Cyto inf = infiziert, mit Cytochalasin B induzierte BFGC

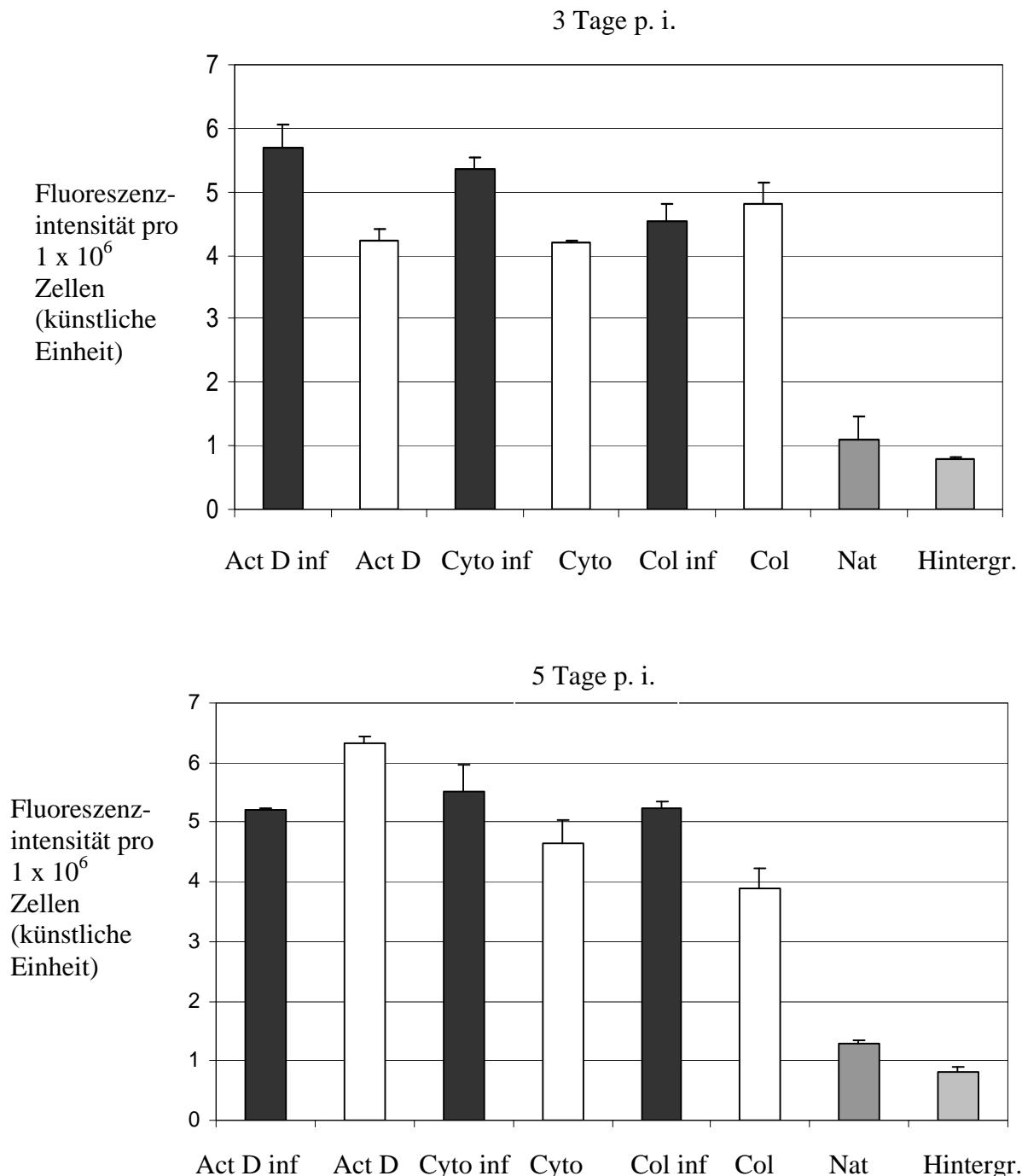
Cyto = nicht infiziert, mit Cytochalasin B induzierte BFGC

Col inf = infiziert, mit Colchicin induzierte BFGC

Col = nicht infiziert, mit Colchicin induzierte BFGC

Nat = nicht infizierte, nicht induzierte Negativkontrolle

Die in der Folge vergleichend mit infizierten und nicht infizierten BFGC und Vero-Zellen durchgeführten Studien verliefen enttäuschend. Unabhängig vom Induktor ließen sich weder bei BFGC noch bei Vero-Zellen infektionsbedingte Unterschiede in der Fluoreszenzintensität darstellen. Abbildung 15 zeigt stellvertretend für die anderen Experimente die Ergebnisse an den Tagen 3 und 5 p. i., bei denen kein Zusammenhang zwischen der gemessenen Fluoreszenzstärke und einer *E. bovis*-Infektion erfassbar war.

**Abbildung 23**

**Caspase 3-assoziierte Fluoreszenzintensität nach Apoptoseinduktion bei *E. bovis*-infizierten und nicht infizierten BFGC**

An Tag 3 p. i. und an Tag 5 p. i. konnte weder ein deutlicher noch wiederholbarer Unterschied der Fluoreszenzintensität zwischen infizierten und nicht infizierten Zellrasen gezeigt werden.

Act D inf = infiziert, mit Actinomycin D induzierte BFGC

Act D = nicht infiziert, mit Actinomycin D induzierte BFGC

Cyto inf = infiziert, mit Cytochalasin B induzierte BFGC

Cyto = nicht infiziert, mit Cytochalasin B induzierte BFGC

Col inf = infiziert, mit Colchicin induzierte BFGC

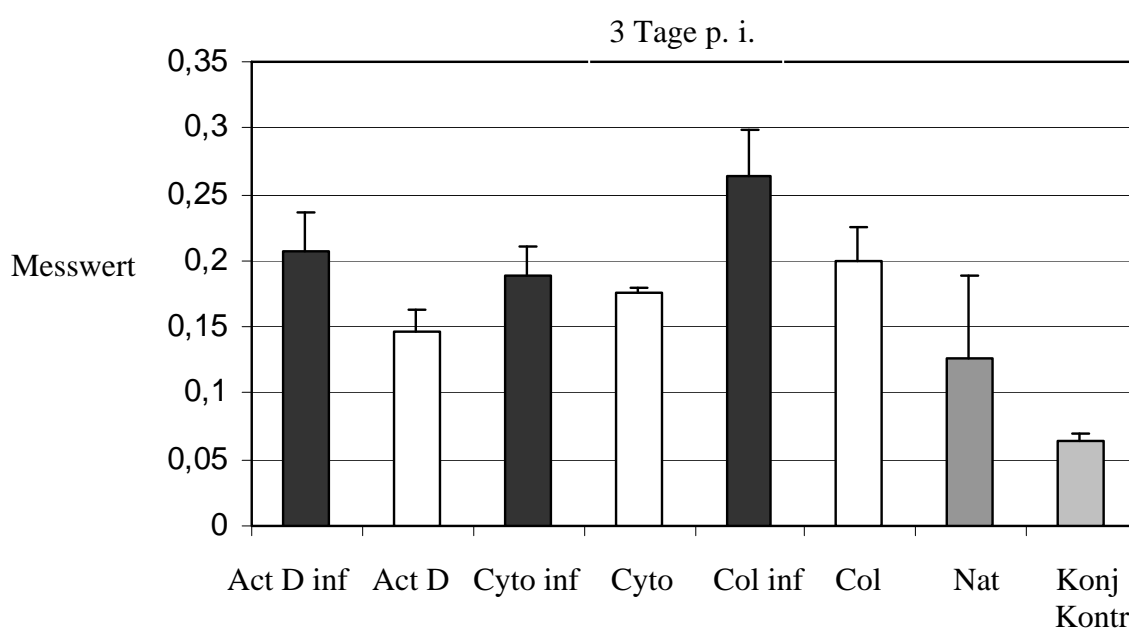
Col = nicht infiziert, mit Colchicin induzierte BFGC

Nat = nicht infizierte, nicht induzierte Negativkontrolle

#### 4.7 Versuch der Quantifizierung der Apoptose durch den Nachweis von Cytochrom-c als Indikator für den mitochondrialen Weg der Apoptose (Untersuchungen mittels ELISA)

Cytochrom-c wird bei Zellstress aus den Mitochondrien ausgeschüttet, um den inneren Weg des programmierten Zelltodes über die Bildung eines Apoptosoms und der anschließenden Aktivierung der Caspase 3 einzuleiten. Die Ausschüttung von Cytochrom-c findet sehr früh nach Induktion der Apoptose statt, sodass sich ein Nachweisfenster von 3 bis 5 h post inductionem ergibt.

In Vorversuchen mit nicht infizierten BFGC wurde unter Verwendung des Zymed® Cytochrom-c ELISA Kit ein geeigneter Zeitpunkt für den Nachweis von Cytochrom-c gesucht. Neben den Zeitpunkten 3 h, 4 h und 6 h nach der Induktion wurde auf Anraten von Herrn Dr. Lüder (Göttingen) zusätzlich ein Nachweis nach 8 h geführt. An allen gewählten Zeitpunkten ließ sich nur eine sehr schwache Expression von Cytochrom-c ermitteln. Wie in den vorangegangenen Versuchen zur Quantifizierung wurden infizierte mit nicht infizierten BFGC verglichen, die mit den Induktoren Actinomycin D, Cytochalasin B und Colchicin behandelt worden waren. Als Kontrolle wurden eine nicht infizierte, nicht induzierte Probe, sowie eine Konjugatkontrolle mitgeführt. Wie aus Abb. 24 ersichtlich, ergaben sich jedoch auch in diesen Experimenten weder am Tag 3 noch am Tag 5 p. i. Unterschiede, die auf eine unterschiedliche Reaktion zwischen infizierten induzierten und nicht-infizierten induzierten Zellen schließen lassen.





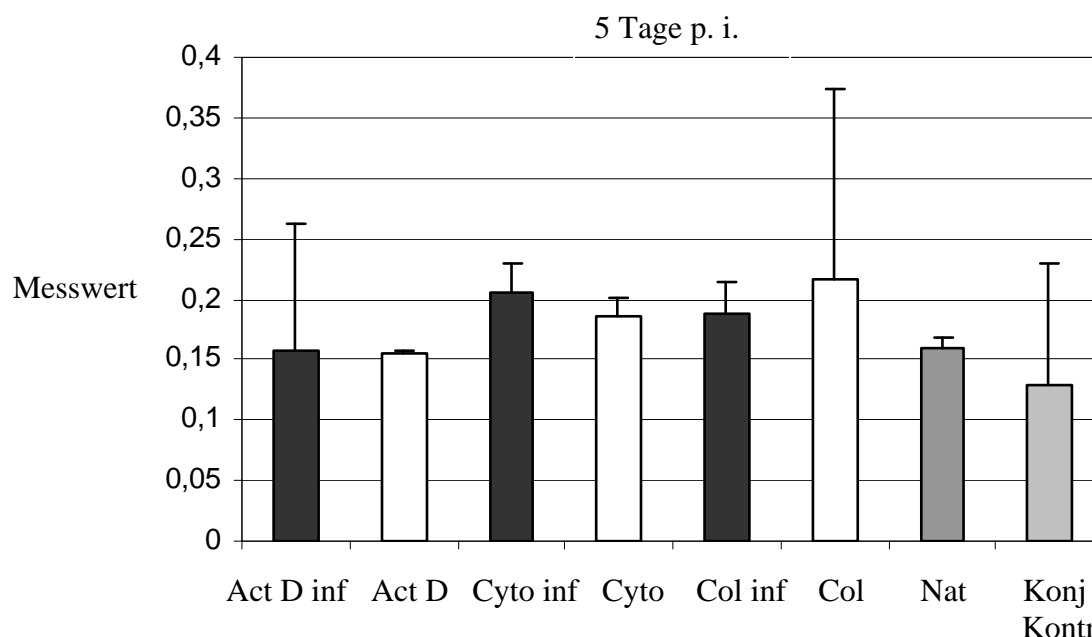


Abbildung 24

#### Cytochrom-c-Nachweis nach Apoptoseinduktion bei *E. bovis*-infizierten und nicht infizierten BFGC 3 und 5 Tage p. i.

An beiden Messterminen zeigte sich ein uneinheitliches Bild der Cytochrom-c-Ausschüttung nach der Apoptoseinduktion in infizierten und nicht infizierten Zellen. Der Nachweis von Cytochrom-c war im Vergleich mit der nicht induzierten, nicht infizierten Negativkontrolle (Nat) sehr gering.

Act D inf = infiziert, mit Actinomycin D induzierte BFGC

Act D = nicht infiziert, mit Actinomycin D induzierte BFGC

Cyto inf = infiziert, mit Cytochalasin B induzierte BFGC

Cyto = nicht infiziert, mit Cytochalasin B induzierte BFGC

Col inf = infiziert, mit Colchicin induzierte BFGC

Col = nicht infiziert, mit Colchicin induzierte BFGC

Nat = nicht infizierte nicht induzierte Negativkontrolle

#### 4.8 Einfluss von *E. bovis* auf Apoptosewege

Eine nähere Charakterisierung der Mechanismen, über die *E. bovis* die Apoptosefähigkeit der Wirtszelle beeinflusst, erfolgte in konfokalmikroskopischen Studien an Einzelzellen. Für die Aufnahmen wurde eine 630fache optische Vergrößerung gewählt und eine Pinhole-Größe von 1 verwendet. Alle drei Kanäle des Argon-Krypton Lasers mit einer Exzitation/ Emission von 488 nm, 567 nm und 648 nm wurden genutzt.

Als Wirtszellen wurden BFGC verwendet. Der Nachweis beruhte auf Expression der intrazellulären Apoptosehemmer c-IAP1, c-FLIP und Bcl2. Da c-IAP1 auf der Ebene der Effektorcaspasen zentral in die Apoptose eingreift, kann dieses Protein unabhängig von den jeweiligen Wegen des programmierten Zelltodes die Apoptose inhibieren. Mit dem Protein c-FLIP, das auf der Ebene von Caspase 8 die Apoptose blockiert, sollte ein Apoptosehemmer des rezeptorvermittelten Weges untersucht werden. Bcl2 ist als Apoptoseinhibitor des mitochondrialen Weges bekannt. Die Messungen erfolgten 3 und 5 Tage p. i.. Ausgehend von der Annahme, dass der Sporozoit keine variablen Strategien bei Verwendung unterschiedlicher Apoptoseinduktoren nutzt, wurde aus arbeitstechnischen Gründen nur Colchicin zur Auslösung der Apoptose genutzt. Es wurden sowohl infizierte, Colchicin-behandelte, als auch nicht infizierte, Colchicin-behandelte Zellen untersucht. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte, nicht induzierte Zellen mitgeführt.

Im Rotkanal der konfokalmikroskopischen Untersuchung erfolgte die Darstellung der Texas Red-gefärbten Sporozoiten (persönliche Mitteilung Hermosilla und Taubert). Im Blaukanal wurden durch die Färbung der Nukleinsäuren mit TOTO-3 die Zellkerne der Wirtszellen sichtbar gemacht. Im Falle von BFGC fand zudem eine Färbung des Zytosols statt. Auch konnten auf diese Weise die Sporozoiten dargestellt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Sporozoiten in der jeweils untersuchten Wirtszelle befanden. Im Grünkanal sollte über die spezifischen, FITC-markierten Antikörper die Expression der Apoptosehemmer nachgewiesen werden.

#### 4.8.1 Nachweis von c-IAP1

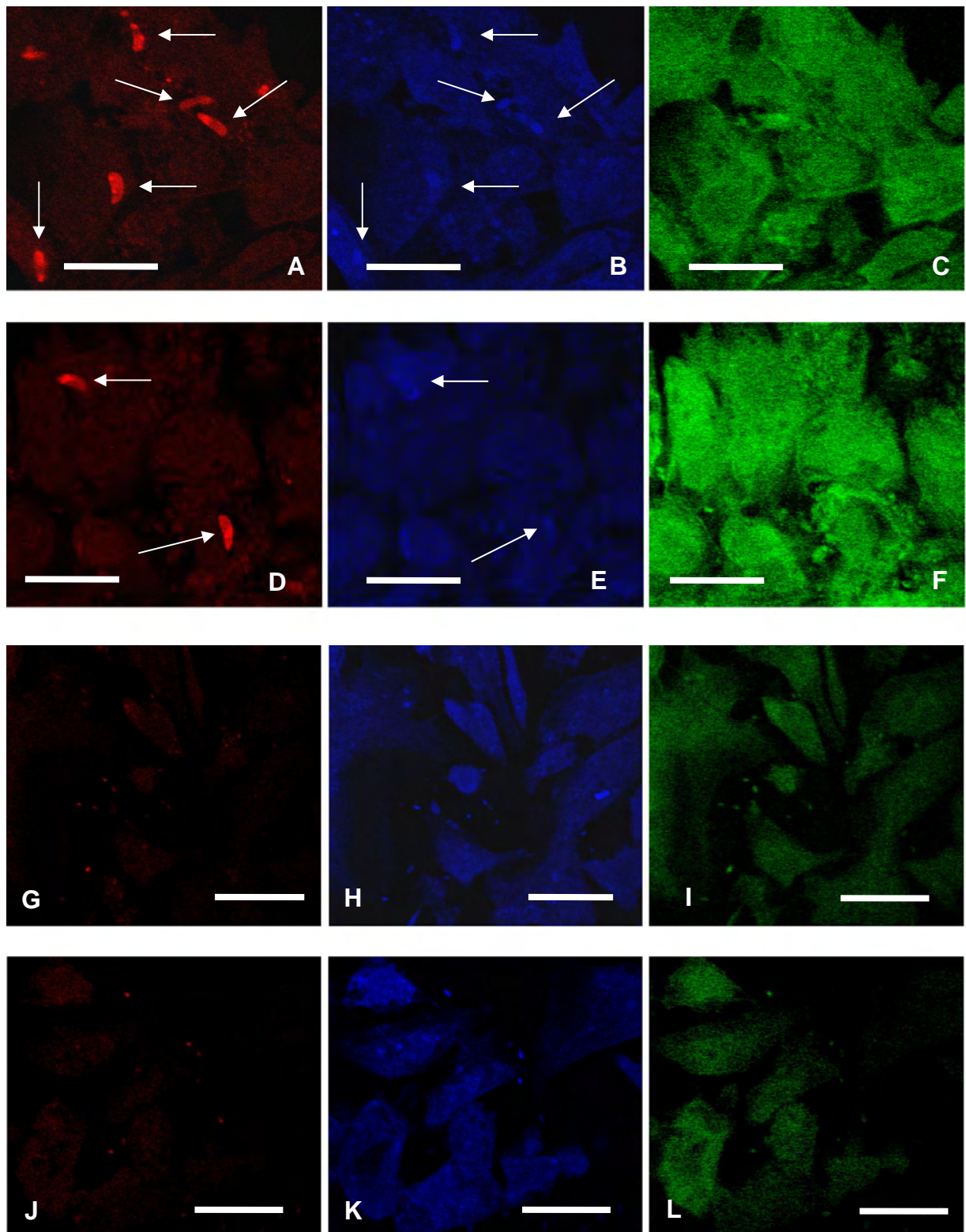
##### 4.8.1.1 Nachweis von c-IAP1 mittels konfokalmikroskopischer Untersuchungen

Bei diesem Nachweis wurde die Intensität der Grünfluoreszenz, die mit der Expression von c-IAP1 korreliert, in infizierten Zellen infizierter Zellrasen und nicht infizierten Zellen nicht infizierter Zellrasen mittels Konfokalmikroskopie vergleichend betrachtet.

In *E. bovis* infizierten Zellen zeigten sich bei konfokalmikroskopischen Aufnahmen im Rotkanal die mit Texas Red gefärbten Sporozoiten [Abb. 25 (A) und (D)]. Mit diesem Farbstoff, der im Zytosol bindet, ließen sich auch die refraktilen Körperchen der Parasiten gut zeigen. Im Blaukanal stellten sich die Wirtszellen und die intrazellulären Sporozoiten, die sich ebenso mit dem Farbstoff anfärbten, dar [Abb. 25 (B) und (E)]. Die Intensität der Grünfluoreszenz, die der Expressionsstärke von c-IAP1 entspricht, war in infizierten BFGC sehr hoch und gleichmäßig im Zytosol der Zelle verteilt [Abb. 25 (C) und (F)]. Auffällig war

bei der Betrachtung infizierter Zellrasen, dass nicht nur die infizierten Zellen selbst eine starke Grünfluoreszenz aufwiesen, sondern auch nicht infizierte Zellen, die Kontakt zu infizierten Zellen hatten [Abb.25 (D) bis (F)]. Zellen des infizierten Zellrasens, die nicht in unmittelbarer Nähe zu infizierten Zellen lagen, zeigten eine ähnlich schwache Fluoreszenzintensität wie die Zellen des nicht infizierten Zellrasens.

Nicht infizierte, mit Colchicin behandelte Zellen, deren Rotkanal aufgrund der fehlenden Infektion mit gefärbten Sporozoiten leer blieb, zeigten ebenso im Blaukanal eine deutliche Fluoreszenz, die auf die Färbung mit TOTO-3 zurückzuführen ist. Bei der Betrachtung der Zellgrenzen und der Anordnung der Zellen fielen häufig unregelmäßige Zellränder und lückenhafte Zellrasen auf, was den Vorgang der Apoptose widerspiegelte [Abb. 25 (H) und (K)]. Im Grünkanal konnte eine schwache Fluoreszenz nachgewiesen werden. Eine Aussage über die Fluoreszenzintensität war nur im direkten Vergleich mit der Negativkontrolle und infizierten Zellen zu treffen. Hierbei lässt sich sagen, dass die Fluoreszenz in nicht infizierten Zellen stets schwächer war als in infizierten Zellen [Abb. 25 (I), (L) und (C), (F)] aber stärker als in der nicht induzierten Negativkontrolle. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Grünfluoreszenz sowohl bei infizierten, als auch bei nicht infizierten BFGC keine Anreicherungen in bestimmten Arealen der Zelle aufwies, was für eine gleichmäßige Verteilung von c-IAP1 im Zytoplasma der Zelle spricht [Abb. 25 (C), (F), (I) und (L)].



**Abbildung 25**

**Konfokalmikroskopischer Nachweis von c-IAP1 in infizierten, induzierten und nicht infizierten, induzierten BFGC**

**A-F** Nachweis von c-IAP1 in *E. bovis* infizierten BFGC

**G-L** Nachweis von c-IAP1 in nicht infizierten BFGC

**(A, D, G, J)** Färbung mit Texas Red; rot fluoreszierende Sporozoiten

**(B, E, H, K)** Färbung mit TOTO-3; blau-Färbung der Nukleinsäuren und des Zytosols der Zellen und der Sporozoiten

**(C, F, I, L)** Färbung mit gegen c-IAP1 gerichtetem Antikörper, Visualisierung über FITC-markierten Sekundärantikörper

**(A-C und D-F)** Abbildungsreihen infizierter Zellen. Deutlich gefärbte Sporozoiten mit leuchtendem Refraktilkörper im Rotkanal. Im Blaukanal waren die Sporozoiten, die durch TOTO-3 ebenso gefärbt wurden wie die Zellen, in der Wirtszelle zu erkennen. Im Grünkanal zeigte sich eine starke, diffuse Grünfärbung der Wirtszelle, die auf eine vermehrte Expression von c-IAP1 im Zytosol der Wirtszelle schließen lässt.

**(D-F)** zeigt, dass in dem gewählten Bildausschnitt nur 2 Zellen infiziert sind. Trotzdem kam es auch zu einer verstärkten c-IAP1-Expression in den Nachbarzellen.

Die Abbildungsreihen **(G-I)** und **(J-L)** zeigen jeweils nicht infizierte BFGC. Der Rotkanal blieb hierbei bis auf eine Anfärbung unspezifischer Granula erwartungsgemäß leer. Eine Anfärbung der Zellen mit TOTO-3 fiel genauso stark aus, wie bei infizierten Zellen. Im Grünkanal dagegen war im Vergleich mit infizierten Zellen eine deutlich schwächere Fluoreszenz zu erkennen (alle Messbalken 20 µm).

Um die Unterschiede der Fluoreszenzintensität des Grünkanals zu erfassen, die in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden konnten, wurden insgesamt ca. 120 Einzelzellen mit Hilfe der Software Image Quant<sup>®</sup> analysiert. Für den Vergleich wurde die Signalstärke sowohl in infizierten Zellen aus infizierten Zellrasen, als auch in nicht infizierten Zellen aus nicht infizierten Zellrasen untersucht.

Als Voraussetzung für die Berechnung der Signifikanz der gewonnenen Daten wurde zunächst festgestellt, dass die erfassten Werte der relativen Fluoreszenzintensitäten in infizierten und nicht infizierten BFGC normal verteilt waren. (Abb. 26 und 27). Hierfür wurden die gemessenen Fluoreszenzen der infizierten und nicht infizierten Zellen jeweils durch den arithmetischen Mittelwert geteilt. Der p-Wert im anschließenden einseitigen T-Test war  $< 0,001$ . Somit ist der Unterschied der Fluoreszenzintensität zwischen infizierten und nicht infizierten BFGC hochsignifikant.

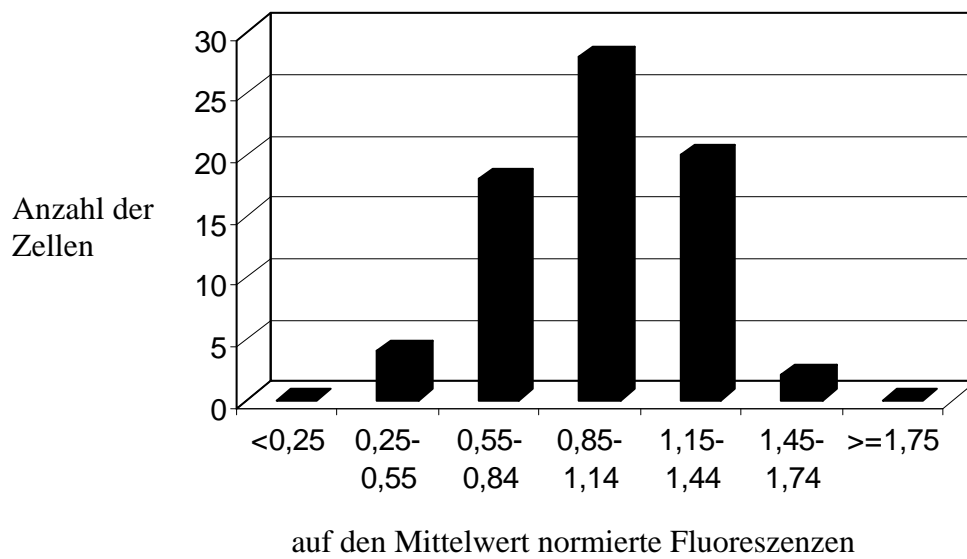


Abbildung 26

Verteilung der relativen c-IAP1-Fluoreszenzintensität von Einzelzellen in induzierten, *E. bovis*-infizierten Zellrasen

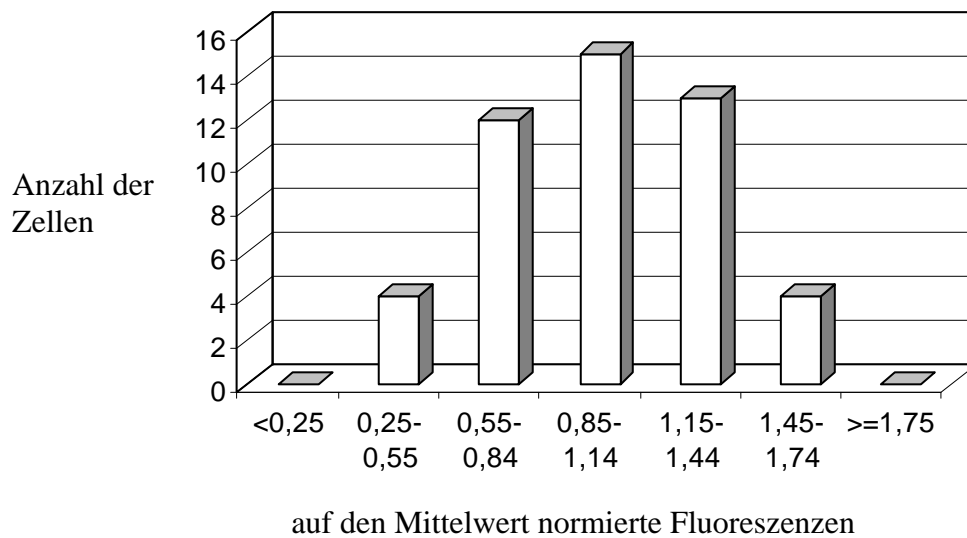
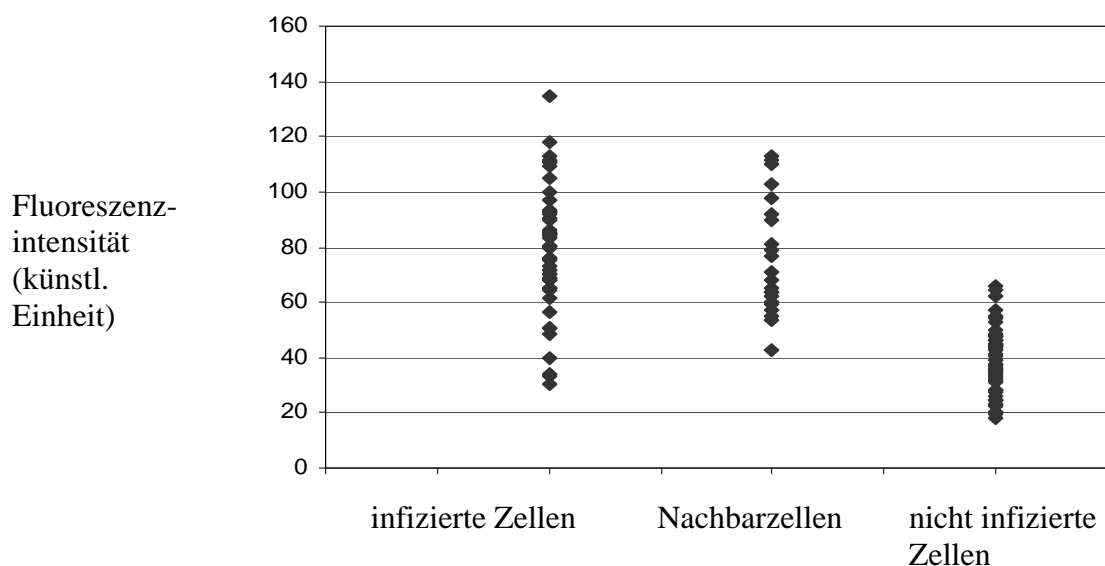


Abbildung 27

Verteilung der relativen c-IAP1-Fluoreszenzintensität von Einzelzellen in induzierten, nicht infizierten Zellrasen

Im Vergleich der gemessenen Fluoreszenzintensitäten zwischen induzierten, *E. bovis*-infizierten und induzierten nicht infizierten BFGC erwies sich, dass die maximale Fluoreszenz in nicht infizierten BFGC nur halb so hoch war wie in infizierten BFGC. Da die Fluoreszenzintensität die Menge des exprimierten c-IAP1-Proteins widerspiegelt, lässt dies auf eine deutlich erhöhte Expressionsrate in infizierten Zellen schließen. Nimmt man für den Vergleich die hier verwendete künstliche Messeinheit zu Hilfe, so ergibt sich für infizierte BFGC ein Bereich von 25 bis 135 und bei nicht infizierten BFGC ein Bereich von 19 bis 65 (Abb. 28). Mehrfachinfektionen, wie sie in einigen Fällen beobachtet wurden, beeinflussten die Fluoreszenzintensität jedoch nicht zusätzlich.

Da in den konfokalmikroskopischen Analysen regelmäßig aufgefallen war, dass auch die Nachbarzellen infizierter Zellen eine ähnlich starke Fluoreszenz wie die infizierten Zellen selbst aufwiesen, wurde auch hier eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten durchgeführt. Dazu wurden die Fluoreszenzen von infizierten BFGC mit denen ihrer Nachbarzellen verglichen. In Nachbarzellen der infizierten Zellen ergab sich eine ähnliche Fluoreszenzstärke wie in *E. bovis* infizierten Zellen (Abb. 28). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass der Sporozoit nicht nur direkt die infizierte Zelle in ihrer Expression von c-IAP1 beeinflussen kann, sondern dass sich die Infektion auch in benachbarten Zellen niederschlägt. Ein solches Phänomen könnte über einen „parakrinen Effekt“ zustande kommen.



**Abbildung 28**

**Quantitative Erfassung der c-IAP1-Expression von Apoptose-induzierten, *E. bovis*-infizierten Zellen und deren Nachbarzellen in infizierten Zellrasen und Apoptose-induzierten Zellen nicht infizierter Zellrasen ( $p < 0,001$ )**

Es ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität von c-IAP1 in nicht infizierten Zellen eindeutig niedriger ist als in infizierten Zellen. Hingegen liegt die Fluoreszenzintensität von Zellen, die in direkter Nachbarschaft von infizierten Zellen liegen, im gleichen Fluoreszenzbereich wie die infizierten Zellen selbst.

#### 4.8.1.2 Nachweis von c-IAP1 im Immunoblot

Im Immunoblot wurden zum Nachweis von c-IAP1 infizierte und nicht infizierte BFGC, die mit Actinomycin D, Cytochalasin B und Colchicin behandelt worden waren, als Antigene eingesetzt. Dabei gelang es trotz der signifikanten Unterschiede in der Expression von c-IAP1 zwischen infizierten und nicht infizierten Einzelzellen und des „parakrinen Effekts“ in infizierten Zellrasen nicht, einen erhöhten c-IAP1-Gehalt nachzuweisen (ohne Abbildung).



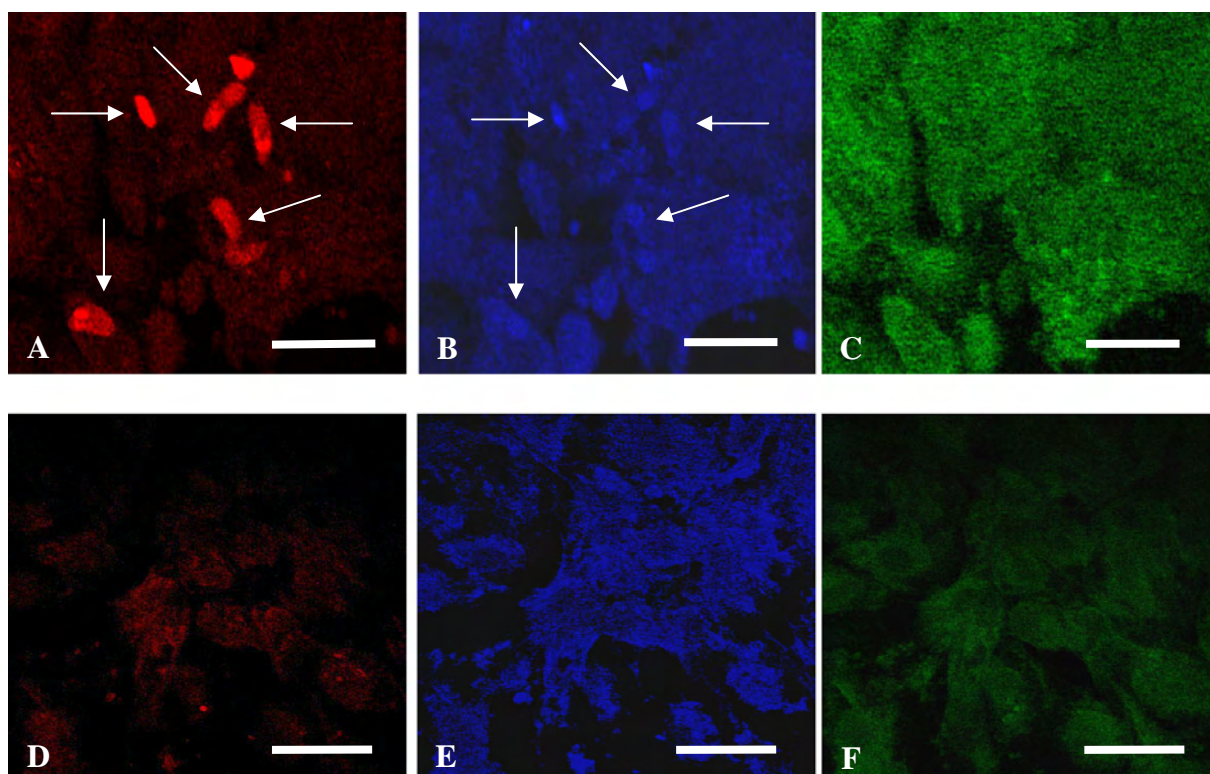
#### 4.8.2 Nachweis von c-FLIP

##### 4.8.2.1 Nachweis von c-FLIP mittels konfokalmikroskopischer Untersuchungen

Um den Apoptoseinhibitor c-FLIP nachzuweisen, wurde wie bei c-IAP1 verfahren, d.h. es wurden nicht infizierte, Colchicin-behandelte BFGC mit *E. bovis* infizierten, Colchicin-behandelten BFGC verglichen. Als Negativkontrolle dienten abermals nicht infizierte, nicht induzierte Zellen. Die konfokalmikroskopische Analyse zur c-FLIP-Expression brachte ähnliche Ergebnisse wie bei c-IAP1.

*E. bovis* infizierte Zellen zeigten im Rotkanal mit Texas Red gefärbte Sporozoiten, die an ihrer Form, Größe und dem Refraktilen Körperchen zu identifizieren waren [Abb. 29 (A)]. Im Blaukanal konnten sowohl die TOTO-3 gefärbten BFGC [Abb. 29 (B)], als auch die Sporozoiten (Pfeile) dargestellt werden. In infizierten Zellen war die Intensität der Grünfluoreszenz stark ausgeprägt [Abb. 29 (C)]. Im Gegensatz zu c-IAP1 ließ sich jedoch im Falle von c-FLIP nur in den infizierten Zellen eine gesteigerte Fluoreszenzintensität aufzeigen. Ein „parakriner“ Effekt trat demnach bei der c-FLIP-Expression nicht auf.

Wie auch bei c-IAP1 blieb in nicht infizierten BFGC der Rotkanal durch die fehlende Infektion leer. Die mit Colchicin behandelten Zellen waren durch die Färbung mit TOTO-3 darstellbar [Abb. 29 (E)] und zeigten auch hier unregelmäßige Zellränder, die auf die stattfindende Apoptose hinwiesen [Abb. 29 (E)]. Die mit der Expressionsstärke von c-FLIP korrelierende Grünfluoreszenz war, wie im Vergleich mit infizierten Zellen deutlich wurde, schwach ausgeprägt [Abb. 29 (F)]. Auch hier war die Fluoreszenz gleichmäßig im Zytoplasma der Zellen verteilt.



**Abbildung 29**

**Konfokalmikroskopischer Nachweis von c-FLIP in infizierten induzierten und nicht infizierten induzierten BFGC**

**A-C** Nachweis von c-FLIP in *E. bovis* infizierten BFGC

**D-F** Nachweis von c-FLIP in nicht infizierten BFGC

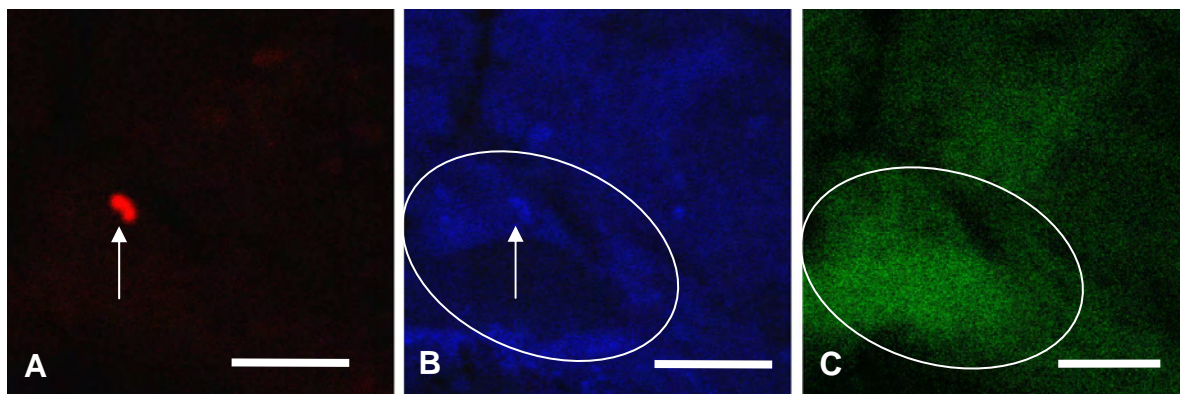
**(A und D)** Färbung mit Texas Red, rot fluoreszierende Sporozoiten

**(B und E)** Färbung mit TOTO-3, blau fluoreszierende Zellen und Sporozoiten

**(C und F)** Färbung mit gegen c-FLIP gerichtetem Antikörper, Visualisierung über FITC-markierten Sekundärantikörper

**(A):** Texas Red-gefärbte Sporozoiten mit stark fluoreszierenden Refraktilkörperchen waren in infizierten BFGC zu erkennen (Pfeile). **(B):** Nach TOTO-3-Färbung ließen sich die Sporozoiten (Pfeile) den entsprechenden Wirtszellen zuordnen. **(C):** Im Grünkanal zeigte sich eine diffuse, zytosolische, starke Grünfluoreszenz, die der Expressionsintensität von c-FLIP entspricht.

Nicht infizierte Zellen stellen sich im Rotkanal erwartungsgemäß leer dar **(D)**. **(E):** Nach TOTO-3-Färbung ließen sich BFGC mit unregelmäßigen Zellrändern erkennen, die auf apoptotische Vorgänge hinweisen. **(F):** Die Fluoreszenz im Grünkanal von nicht infizierten Zellen stellt sich deutlich schwächer dar, als die von infizierten Zellen (alle Messbalken 20 µm).

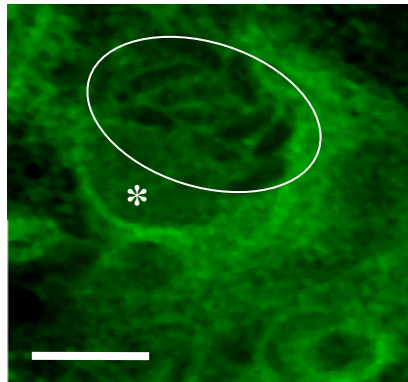


**Abbildung 30**

**Konfokalmikroskopischer Nachweis von c-FLIP in einer einzelnen, infizierten BFGC**

Es ist zu erkennen, dass lediglich die mit dem Sporozoiten (Pfeil) infizierte Wirtszelle (Eingrenzung) eine verstärkte Expression von c-FLIP aufweist. Die Nachbarzellen fluoreszieren schwach grün (alle Messbalken 30 µm).

Die Abbildungen 25 und 29 zeigen, dass die Apoptoseinhibitoren c-IAP1 und c-FLIP stets diffus im Zytosol der Zelle vorlagen. Abbildung 31 verdeutlicht die Verteilung der c-FLIP-Expression innerhalb einer mehrfach infizierten BFGC.

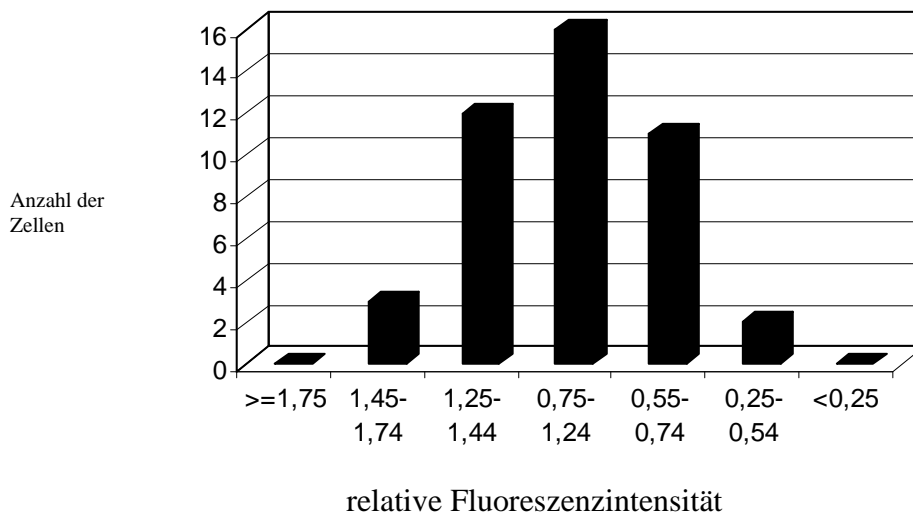


**Abbildung 31**

**Expression von c-FLIP in einer mit *E. bovis* Sporozoiten mehrfach infizierten Zelle**

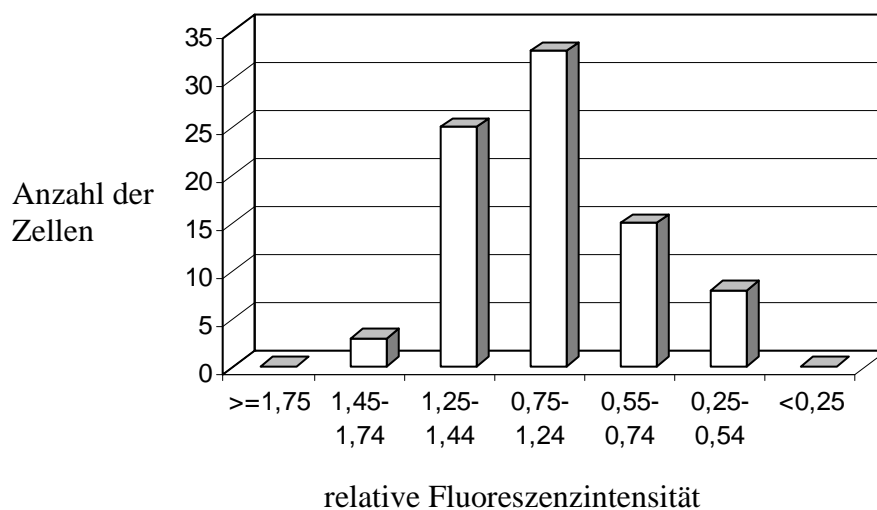
Die Sporozoiten (Eingrenzung) der mehrfach infizierten BFGC zeigten selbst keine Expression von c-FLIP (Kern der Wirtszelle\*).

Für den Apoptoseinhibitor c-FLIP wurde eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensität unter Verwendung des Programms Image Quant<sup>®</sup> durchgeführt. Dabei wurden die Fluoreszenzen von insgesamt ca. 130 Einzelzellen von infizierten Zellen aus infizierten Zellrasen und nicht infizierten Zellen aus nicht infizierten Zellrasen berücksichtigt. Die relativen Fluoreszenzintensitäten waren normalverteilt (Abb. 32 und Abb. 33) und unterschieden sich bei infizierten und nicht infizierten Zellen voneinander signifikant ( $p < 0,001$ ). Vergleicht man die relative Fluoreszenz von nicht infizierten mit infizierten BFGC (Abb. 34), so ergibt sich für infizierte BFGC ein Bereich von 20 bis 75 gegenüber 7 bis 37 bei nicht infizierten BFGC.



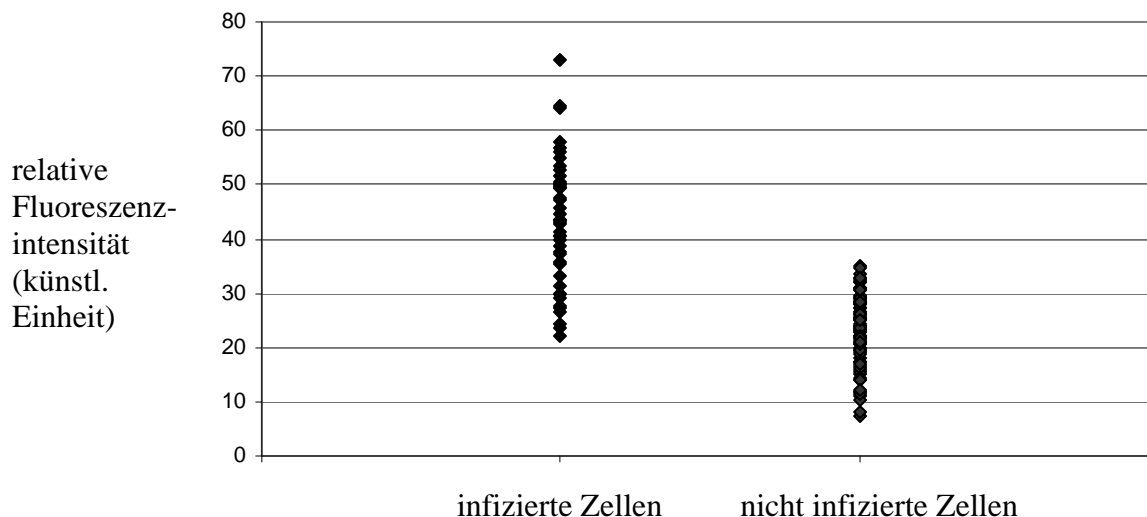
**Abbildung 32**

**Verteilung der relativen c-FLIP-Fluoreszenzintensität von Einzelzellen in induzierten, *E. bovis*-infizierten Zellrasen**



**Abbildung 33**

**Verteilung der relativen c-FLIP-Fluoreszenzintensität von Einzelzellen in induzierten, nicht infizierten Zellrasen**



**Abbildung 34**

**Quantitative Erfassung der c-FLIP-Expression von Apoptose-induzierten, *E. bovis*-infizierten Zellen und deren Nachbarzellen in infizierten Zellrasen und Apoptose-induzierten Zellen nicht infizierter Zellrasen ( $p < 0,001$ )**

#### 4.8.2.2 Nachweis von c-FLP im Immunoblot

Der verwendete Antikörper richtet sich gegen die Aminosäuren 447-464 des humanen c-FLIP. Er erkennt nach Angaben des Herstellers beide Isoformen des humanen c-FLIP (28kDa, 55kDa) sowie ein Spaltprodukt von 39 kDa.

Im Immunoblot wurde in infizierten Zellen vom 3. und 5. Tag p. i. nach Behandlung mit Cytochalasin B und Colchicin eine Proteinbande erkannt. Banden im Bereich von 28 kD oder 55 kD konnten jedoch nicht festgestellt werden. Da es sich bei den 39 kDa-Banden jedoch nach Herstellerangaben um ein Spaltprodukt von c-FLIP handelt, konnten somit die Einzelzellergebnisse zur vermehrten Expression von c-FLIP in infizierten Zellen bestätigt werden. Die Apoptose wurde bei infizierten und nicht infizierten BFGC an 2, 3, 5 und 7 Tage p. i. mit Actinomycin D, Cytochalasin und Colchicin induziert. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte, nicht induzierte BFGC verwendet, und als Positivkontrolle dienten HeLa-Zellen, die laut Hersteller des Antikörpers, den Apoptoseinhibitor konstitutiv exprimieren. Im Falle von Cytochalasin B und Colchicin ließ sich in infizierten BFGC lediglich das Spaltprodukt bei 39 kDa an Tag 2, 3 und 5 als schwache Bande erkennen. Bei nicht infizierten Zellen war diese Bande sehr viel undeutlicher oder gar nicht vorhanden (ohne Abb.).

#### 4.8.3 Nachweis von Bcl-2

In der konfokalmikroskopischen Analyse konnte zwischen *E. bovis* infizierten und nicht infizierten Zellen kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Sowohl bei infizierten, als auch bei nicht infizierten Zellen und bei der mitgeführten Negativkontrolle waren lediglich schwache Grünfluoreszenzen zu beobachten, die sich nicht voneinander unterschieden. Der Primärantikörper wurde in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe getestet, was zu keiner Veränderung im Ergebnis führte. Ebenso führte die Verwendung eines anderen Sekundärantikörpers nicht zum Erfolg. Es konnte kein Nachweis von Bcl2 in konfokalmikroskopischen Untersuchungen erbracht werden. Ebenso war im anschließenden Immunoblot kein Bcl-2 in *E. bovis* infizierten oder nicht infizierten Zellen nachweisbar.

## 5 Diskussion

*E. bovis* benötigt zum Abschluss der ersten Merogonie in Endothelzellen *in vivo* und *in vitro* mit bis 20 Tagen einen vergleichsweise langen Zeitraum (Hammond et al., 1963), in dem das Überleben der Wirtszelle gesichert sein muss. Dabei erfährt die Wirtszelle eine starke Größenzunahme. Das und die damit einhergehende zytoskelettale Umformung (pers. Mittl. Hermosilla) stellt einen immensen Stress für die parasitierte Zelle dar. Besonders anschaulich zeigt sich dieses Phänomen bei infizierten BUVEC deren ursprüngliche Größe stark expandiert, wobei die Zellorganellen zum Teil verdrängt werden. Aktin, das sich um die PV anordnet, dient vermutlich dazu, den wachsenden Schizonten zu stabilisieren. Die zu erwartende Reaktion einer Zelle auf eine parasitäre Besiedelung, sowie ihre Formveränderung und Umstrukturierung durch einen intrazellulären Erreger, ist die Einleitung des programmierten Zelltodes und ihre Markierung für Phagozyten.

Dass die langandauernde Entwicklung zum reifen Schizonten unabhängig von der allgemeinen Lebensdauer der Endothelzelle über bestimmte Mechanismen gesichert wird, zeigen die Ergebnisse bei der Merontenentwicklung in BUVEC, in deren Verlauf immer wieder beobachtet werden konnte, dass ein Großteil der nicht infizierten Zellen abstirbt, während die Parasiten enthaltenden Zellen persistieren. Da nicht infizierte Zellrasen über den beobachteten Beobachtungszeitraum intakt bleiben, erhebt sich die Frage, ob das Absterben nicht infizierter Zellen im infizierten Zellrasen mit der Reifung des Meronten im Zusammenhang steht. Über die Ursachen kann derzeit allenfalls spekuliert werden. Da es sich bei BUVEC um eine sehr empfindliche Zelllinie handelt, die schon auf geringe mechanische Irritation mit Apoptose reagiert, könnte eine Erklärung sein, dass die Raumforderung der infizierten Zelle die Nachbarzellen stark beeinträchtigt. Eher unwahrscheinlich erscheint, dass über Komponenten aus den sich vermehrenden Parasiten eine Apoptose eingeleitet wird, da eine protektive Wirkung auf Nachbarzellen der infizierten Wirtszelle angenommen werden kann. Zumindest war bei der Zelllinie BFGC die Synthese des Apoptosehemmers c-IAP1 in Nachbarzellen infizierter Zellen 3 und 5 Tage p. i. ähnlich gesteigert, wie in der Wirtszelle selbst. In einer *in vivo*-Situation erscheint eine Schädigung nicht infizierter Zellen durch die Wirtszelle auch paradox, denn damit würde die unmittelbare Umgebung des reifenden Meronten beeinträchtigt. Von Interesse erscheint weiterhin, dass in der Spätphase der Merontenentwicklung anscheinend ein Proliferationsstimulus wirkt, der zum erneuten Auswachsen einer nicht infizierten Zellpopulation führt. In einer *in-vivo*-Situation könnte dies als Reparaturschritt verstanden werden. Es bleibt mit geeigneten Methoden zu überprüfen, ob *E. bovis* infizierten Endothelzellen mit reifen Meronten I z.B.

Wachstumsfaktoren freigesetzt werden. In Anbetracht der Entwicklung von *E. bovis in vivo* und der oben diskutierten Beobachtungen wäre ein *in vitro*-Modell mit BUVEC optimal gewesen. Darauf musste jedoch verzichtet werden, denn die zur Verfügung stehenden BUVEC erwiesen sich alle zu empfindlich, um für die geplanten Untersuchungen eingesetzt werden zu können. Sie reagierten bereits auf minimale Manipulation wie z. B. Mediumwechsel mit dem programmierten Zelltod. Zudem ergaben sich bei der praktischen Arbeit relativ grobe Unterschiede zwischen den einzelnen Zellisolaten.

Als Alternativen boten sich die von Hermosilla et al. (2002) eingeführten BFGC an, eine immortalisierte Zelllinie, die in den eigenen Untersuchungen in Übereinstimmung mit Hermosilla et al. (2002) reproduzierbare Ergebnisse bei der *in vitro*-Kultur von *E. bovis*-Merozoiten I lieferte. Die Entwicklung der Meronten I unterscheidet sich gegenüber BUVEC kaum, die reifen Meronten waren bei BFGC sogar größer als bei BUVEC.

Als weitere Wirtszelle wurden Vero-Zellen eingesetzt, die von *E. bovis*-Sporozoiten invadiert werden, aber als nicht-bovine Zelllinie keine Weiterentwicklung über ein Trophozoitenstadium hinaus erlauben. In Vero-Zellen überlebt *E. bovis* nach Hermosilla et al. (2002) 20 Tage und mehr. Auffallend war, dass der Parasit von einer sehr ausgedehnten und augenfälligen Parasitophoren Vakuole umgeben war. Behrendt et al. (2000) hatten diese Besonderheit für Studien zur Permeabilität der Vakuolenmembran und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den verschiedenen Kompartimenten der infizierten Zelle genutzt und gezeigt, dass die Vakuolenmembran nicht, wie vorher angenommen, als unselektives Sieb fungiert. Das Modell erlaubte den Einfluss des Parasiten auf seine Wirtszelle über einen längeren Zeitraum und unabhängig von seinen Entwicklungsstadien zu verfolgen. Unabhängig vom verwendeten Wirtszelltyp scheint jedoch in der Frühphase der Infektion über einen Zeitraum von 2 Tagen das Verhältnis Wirtszelle-Parasit relativ labil zu sein, da insbesondere am 1. Tag jegliche Manipulation der infizierten Zelle zur Folge hatte, dass die Parasiten ihre Wirtszelle wieder verließen.

Behrendt et al. (2004) konnte zeigen, dass Sporozoiten spontan ihre Wirtszelle verlassen und eine neue Zelle besiedeln können. Der Egress wurde weiterhin durch eine Veränderung des Ionengleichgewichts, hier ausgelöst durch einer Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Wirtszelle durch Ca-Ionophore ausgelöst (Behrendt et al., 2007). Ebenso führten mechanische Reizungen in Vero-Zellen zum Egress. Bei den Versuchen von Behrendt et al. (2007) war eine ähnliche Zeitabhängigkeit wie bei den eigenen Untersuchungen zu beobachten.



Auch die Zugabe von Apoptoseinduktoren zur infizierten Zellkultur 1 Tag nach der Infektion führte zum Egress aller Sporozoiten, während die Zugabe am 2. Tag p.i. weitgehend toleriert wurde und nur noch einzelne Sporozoiten ihre Wirtszelle verließen. Um diese Problematik insgesamt zu umgehen, wurden in den nachfolgenden Studien die Experimente nicht vor dem 3. Tag p.i. durchgeführt.

Zur Induktion der Apoptose wurden die Substanzen Actinomycin D, Cytochalasin B und Colchicin eingesetzt. Actinomycin D, das aus *Streptomyces parvulus* gewonnen wird, ist ein Zytostatikum, gehört zu der Gruppe der zytotoxischen Antibiotika und wird in der Medizin zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt. In niedrigen Dosierungen hemmt es die DNA-abhängige RNA-Synthese. Somit bleibt die Bildung von mRNA aus und die Proteinproduktion sinkt ab. Bei höheren Dosen wird zudem die DNA-Replikation gehemmt, indem die DNA-Polymerase blockiert wird. Actinomycin D wirkt somit phasenunabhängig (Alberts et al., 2002). Im Zusammenhang mit der Apoptoseinduktion wurde eine Aktivierung von p53, eine Hochregulierung des proapoptotischen Proteins Puma und eine Herunterregulation von Bcl2 nachgewiesen (Kalousek et al., 2007). Wang et al. (2007) konnten in mit Actinomycin D behandelte Neuroblastomzellen eine erhöhte Aktivität von Caspase-7 und 9, sowie eine Hochregulation von AIF nachweisen. Cytochalasin B wird aus *Helminthosporium dematioides* gewonnen, bindet an Aktinmoleküle und verhindert die Anlagerung weiteren Aktins. Durch das Blockieren der Polymerisation und Elongation von Aktin verändert es die Zellmorphologie und unterbindet die Zellteilung. Des Weiteren kann Cytochalasin B den Glucosetransport beeinträchtigen (Alberts et al., 2002). Neben der Einleitung der Apoptose über den mitochondrialen Weg konnten Kulm et al. (2002) in Cytochalasin- und UV-behandelten Zellen eine Anhäufung von CD95, einem Fas-Rezeptor, nachweisen. Das weist darauf hin, dass zusätzlich der rezeptorvermittelte Weg der Apoptose eingeleitet wird. Colchicin, ein Alkaloid der Herbstzeitlosen, ist als Mitose-Hemmstoff bekannt und wirkt somit phasenspezifisch. Die Ausbildung der Spindelfasern wird gehemmt, indem es an freie Mikrotubuli-Untereinheiten bindet, die dann nicht mehr für den Spindelfaseraufbau zu Verfügung stehen (Alberts et al., 2002). Der Umstand, dass auf diese Weise den Zellzyklus unterbrochen wird, führt dazu, dass der mitochondriale Weg der Apoptose eingeleitet wird (Saji et al., 2007). Somit konnte durch die Wahl der Apoptoseinduktoren der mitochondriale Weg und der rezeptorvermittelte Weg der Apoptose abgedeckt werden.

Die hier verwendeten Konzentrationen der Apoptoseinduktoren sind kaum mit den Angaben anderer Arbeitsgruppen zu vergleichen, da sie stark von der Dauer der Inkubationszeit

abhängt. Abgesehen davon verhält sich die Induktorkonzentration proportional zur Anzahl der Zellen, bei denen die Apoptose eingeleitet werden soll. Entscheidend ist außerdem, um welche Zelllinie es sich dabei handelt. Dass verschiedene Zelllinien eine sehr unterschiedliche Empfindlichkeit bezüglich der Apoptoseinduktion aufweisen, konnte auch bei den verwendeten BUVEC, BFGC und Vero-Zellen festgestellt werden. BUVEC reagieren auf minimalste Manipulationen spontan mit dem programmierten Zelltod und benötigen hierzu keinen Induktor. BFGC brauchen im Vergleich zu Vero-Zellen eine geringere Konzentrationen der Apoptoseinduktoren und/oder kürzere Inkubationszeiten. Im Falle von Actinomycin D wurden 0,5 µg/ml für beide Zelllinien verwendet, allerdings zeigten BFGC nach 24 h eine 50 %ige Apoptoserate und Vero-Zellen erst nach 48 h (Tabelle 6). Für Cytochalasin B und Colchicin waren bei Vero-Zellen 8 x bzw. 3,5 x höhere Konzentrationen nötig, um die gleiche Apoptoserate wie bei BFGC zu erzielen (Tabelle 6). Die Abhängigkeit von Inkubationszeit und Induktorkonzentration zeigt sich bei der Apoptoseinduktion von BFGC mit Cytochalasin B. Bei einer 24-stündigen Inkubation wird eine Konzentration von 2µg/ml benötigt. Wird die Inkubationszeit allerdings verdoppelt, so halbiert sich die benötigte Konzentration des Induktors (Tabelle 6).

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen sowie die Ergebnisse des Tunel-Assays zeigen dass die eingesetzten Induktorsubstanzen bei *E. bovis*-infizierten BFGC und Vero-Zellen keine Apoptose einleiten. Die nicht infizierten Zellen der jeweiligen infizierten Zellrasen zeigen dagegen, wie die Zellen nicht infizierter Zellrasen, die üblichen Merkmale des programmierten Zelltodes. Im Tunel-Assay konnten die Veränderungen der nicht infizierten Zellen eindeutig apoptotischen Vorgängen zugeordnet werden. Infizierte Zellen hatten demgegenüber offensichtlich ihre Fähigkeit, die Apoptose einzuleiten, verloren. Diese Apoptoseunfähigkeit setzte nach den lichtmikroskopischen Studien ab Tag 2 p. i. ein und hielt über den gesamten Untersuchungszeitraum, d. h. bis zur Entwicklung reifer Schizonten, an. Frühere Zeitpunkte als Tag 2 p. i. stehen aus den oben diskutierten Gründen nicht zur Verfügung. Hermosilla et al. (2006) beobachteten bereits beginnend 30 min p. i. und anhaltend über mehrere Stunden nach der Infektion eine erhöhte Transkription der Gene für Adhäsionsmoleküle. Andererseits wirkt *E. bovis* sehr differenziert auf die Zelle ein. So kommt es erst Stunden nach der *E. bovis*-Infektion in Endothelzellen zu einer gesteigerten CC-Chemokinsynthese, die dann aber über zwei Tage anhält, während die Synthese von CXC-Chemokinen oder Prostaglandinen auch bei massiven Befallsraten der Zelle praktisch nicht induziert wird (Taubert et al. 2005, 2006). Neben der offensichtlich gezielten Aktivierung von Gentranskriptionen vermag *E. bovis* jedoch solche Vorgänge auch nach

unten zu regulieren. Dies konnten Hermosilla et al. (2006) in Bezug auf die TNF $\alpha$ -induzierten Adhäsionsmolekülsynthese in infizierten Endothelzellen und die Auflagerung von Granulozyten an infizierte Endothelzellrasen zeigen. Die Autoren interpretieren dies im Sinne einer Evasionsstrategie des Parasiten wie dies auch für die Verhinderung einer Apoptose der Wirtszelle zu sehen ist. Von Interesse ist, dass die Apoptosefähigkeit sowohl in *E. bovis*-infizierten BFGC als auch Vero-Zellen anhaltend beeinträchtigt bleibt, obwohl es in Vero-Zellen nicht zur Weiterentwicklung des Parasiten kommt. Nach den Beobachtungen von Behrendt et al. (2000), sind Parasiten, die 48 h nach der Infektion von Vero-Zellen freigesetzt werden, immer noch in der Lage erneut Zellen zu invadieren. Es ist anzunehmen, dass *E. bovis* in diesem Zelltyp als Sporozoit persistiert und nicht wie z.B. in BFGC früh in das Trophozoitenstadium übergeht (Hermosilla et al., 2002). Demnach müssen bereits Sporozoiten die Wirtszelle in der besprochenen Weise verändern. Offen bleiben allerdings die Fragen, ob die Mechanismen unabhängig vom Stadium gleich sind und ob die Umstrukturierung der Wirtszelle ein einmaliges Ereignis ist, dessen Folgen anhaltend bleiben, oder ob es einer andauernden Einwirkung von stofflichen Komponenten aus den Parasiten bedarf, die kontinuierlich von diesen abgegeben werden.

Große, z. T. unlösbare Probleme ergaben sich bei der quantitativen Erfassung apoptotischer Zellen. Systembedingte Probleme traten immer dann auf, wenn hierzu die Gesamtpopulation an Zellen von infizierten Zellrasens zur Quantifizierung der apoptotischen Vorgänge mittels Annexin V-, Caspase 3- und Cytochrom-c-Nachweis herangezogen werden mussten. Offensichtlich war die Hauptursache für die Erfolglosigkeit im Wesentlichen die relativ geringe Befallsrate der Zellen. Bei *E. bovis* hat sich in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit anderen Studien (Hermosilla et al., 2002, 2006; Taubert et al. 2006) nie eine Befallsrate von deutlich mehr als 30 % ergeben, auch wenn es bei zahlreichen Zellen zum Mehrfachbefall der Zellen kam. Bis zu 9 Sporozoiten wurden in Einzelfällen in einer Zelle beobachtet. Damit dürften die Mengenunterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Zellrasen als Gesamtheit nicht ausgereicht haben, um Differenzen aufzeigen zu können. Das könnte erklären, dass es zwar regelmäßig möglich war, einen Unterschied zwischen den unbehandelten Kontrollen und mit Apoptoseinduktoren behandelten BFGC und Vero-Zellen darzustellen, jedoch kein Unterschied zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen auf Ebene des Gesamtzellrasens gezeigt werden konnte. Es ließen sich in der Folge bei keinem der Induktoren eine gleichmäßige und reproduzierbare Expression von Cytochochrom-c und Caspase 3 und Annexin V beobachten.

Das nächste grundlegende Problem der Darstellung unterschiedlicher Apoptoseraten bei infizierten und nicht infizierten Zellen ergibt sich aus der qualitativen Differenz der einzelnen Zellrasen. Unabhängig von der Zelllinie wachsen Zellen der gleichen Isolation, die identisch gepflegt werden und lediglich in unterschiedlichen Zellkulturflaschen kultiviert werden, oftmals nicht gleich gut. Die unterschiedlichen Qualitäten der Zellrasen könnte auch der Grund dafür sein, dass sich die einzelnen Zellrasen nicht gleich gut infizieren lassen und, unabhängig von einer Infektion, nicht gleich gut in Apoptose gehen. Einen weiteren Unsicherheitsfaktor des Systems stellt der Sporozoit selbst dar. Auch hier gibt es starke Unterschiede in der Qualität der Sporozoiten je nach Exzystierung. Bekannte Faktoren sind dabei das Alter der verwendeten Oozysten und der Rindergalle. Diese und sicherlich auch andere unbekannte Faktoren entscheiden darüber, wie effektiv der Sporozoit eine Zelle befallen kann und ob und wie rasch es zu einer Weiterentwicklung kommt. Es lässt sich hierbei lediglich vermuten, dass die Fähigkeit zur Kontrollübernahme der Wirtszelle von der Vitalität des Sporozoiten abhängt.

Bei dem Nachweis von Cytochrom-c, Caspase 3 und Annexin V ist zudem eine möglichst genaue Kenntnis des Zeitpunktes der Expression notwendig. Cytochrom-c wird sehr schnell nach Zugabe von Induktoren aus den Mitochondrien ausgeschüttet und ist in der Mehrzahl der Fälle in einem Zeitfenster von 3-5 h nachweisbar (persl. Mittl. Zymed<sup>®</sup> Laboratories). Allerdings ist der Zeitpunkt der Freisetzung von Cytochrom c stark abhängig von der jeweiligen Zelllinie und den verwendeten Induktoren. Da generell nur eine schwache Fluoreszenz beim Cytochrom-c-Nachweis zu sehen war, wurde in Anlehnung an die Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen (persl. Mittl. Lüder, Göttingen) zusätzlich nach 8 h der Nachweis versucht. Allerdings ergab diese Änderung einen kaum verbesserten Nachweis. In diesem Falle könnte die Problematik auch darin liegen, dass kommerziell erhältliche Antikörper und Kits, die für das System Mensch oder Maus entwickelt wurden (für Annexin V wurden humane, und für Cytochrom-c murine Antikörper verwendet) mit den bovinen Proteinen hier nicht im ausreichenden Maß kreuzreagierten.

In weiteren Experimenten wurde versucht, die Mechanismen zu klären, die den programmierten Zelltod in *E. bovis*-infizierten Zellen verhindern. Es konnte gezeigt werden, dass c-IAP1, ein zentral in die Kaskade als Inhibitor eingreifenden Faktor (Roy et al., 1997; Deveraux et al., 1997; Bratton et al., 2001), in infizierten Zellen deutlich stärker exprimiert ist als in nicht infizierten (Abb. 25). Dies konnte auch über quantitative Messungen belegt werden (Abb. 28). Der verstärkte Nachweis von c-IAP1 ließ sich lediglich im Zytosol der infizierten Zelle führen. Die Sporozoiten selbst waren frei von c-IAP1, was einen Hinweis

darauf gibt, dass der Inhibitor nicht von den Sporozoiten selbst stammt, sondern die Produktion des Moleküls in den Wirtszellen induziert wird.

Die Proteinfamilie der IAPs, die ursprünglich in Baculoviren entdeckt wurde, stellt eine potente Gruppe der Caspaseinhibitoren dar (Clem et al., 1996). Das Familienmitglied c-IAP1 kann auf der Ebene der aktivierten Effektorcaspasen 3 und 7 eingreifen. Somit kann c-IAP1 unabhängig davon, ob der programmierte Zelltod über den Perforin/ Granzym B-Weg, den rezeptorvermittelten Weg oder über den mitochondrialen Weg eingeleitet wurde diesen verhindern. Des Weiteren wird über c-IAP1 auch Procaspase-9 und Caspase-9 inhibiert (Deveraux et al., 1998; Roy et al., 1997).

Interessanterweise war mittels Konfokalmikroskopie nicht nur eine verstärkte c-IAP1-Expression in *E. bovis* infizierten Zellen nachzuweisen, sondern es zeigte sich auch eine ähnlich starke Expression dieses Proteins in benachbarten BFGC, was einem „parakrinen Effekt“ entsprechen könnte (Abb. 25 und 28). Dass es bei *E. bovis* zu „parakrinen Effekten“ in nicht infizierten Nachbarzelle kommen kann, konnten Hermosilla et al. (2006) in infizierten BUVEC bereits in einem anderen Zusammenhang beobachten. In einem Durchflusskammertest, bei dem die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an einen *E. bovis* infizierten BUVEC-Monolayer getestet wurde, erwies sich, dass 91 % der von neutrophilen Granulozyten adhären Zellen nicht infiziert und nur 9 % parasitiert waren. Möglicherweise ist die Expression von c-IAP1 in nicht infizierten Nachbarzellen als Absicherung der infizierten Zelle gegen den programmierten Zelltod zu verstehen. So entsteht ein Ring von modulierten Zellen um die befallene Zelle. Betrachtete man das Muster eines Zellrasens, bei dem die Apoptose induziert worden war, so fiel regelmäßig auf, dass zellfreie Felder entstanden, die durch Brücken aus intakten Zellen verbunden waren. Daraus lässt sich schließen, dass eine Zell-zu-Zellkommunikation in Bezug auf den programmierten Zelltod existieren müsste. Ob nun *E. bovis* aktiv diesen Kommunikationsweg nutzt, oder ob die c-IAP1 Expression der parasitierten Zelle automatisch zwischen den Zellen weitergegeben wird, könnte nur spekulativ beantwortet werden. In jedem Fall spricht diese Beobachtung für eine weitere Absicherung des Sporozoiten gegen den programmierten Zelltod seiner Wirtszelle.

In dieser Arbeit ist es zudem gelungen, in *E. bovis*-infizierten Zellen eine erhöhte Expression von c-FLIP nachzuweisen. In konfokalmikroskopischen Bildern zeigten infizierte Zellen eine deutlich stärkere Expression als nicht infizierte (Abb. 29). Das ließ sich wie im Falle von c-IAP1 ebenfalls über quantitative Auswertungen verifizieren (Abb. 34). Auch hierbei ließ sich das Molekül nur im Zytosol der Wirtszelle nachweisen und nicht in Sporozoiten. Die

konfokalmikroskopischen Analysen erfassten eine schwache Expression von c-FLIP und c-IAP1 bereits in induzierten, nicht infizierten Zellen (Abb. 25 und 29). Sobald in einer Zelle die Signalkaskade, die zur Aktivierung der Effektorcaspasen führt, eingeleitet wird, kommt es zur Expression von Apoptosepromotoren und –inhibitoren. Außer dass diese Regulatoren die Aktivierung von Caspasen verursachen bzw. hemmen, haben sie die Eigenschaft sich gegenseitig zu verstärken oder zu blockieren. Da in einer induzierten Zelle proapoptotische und antiapoptotische Proteine vorhanden sind, hängt die Entscheidung, ob eine Zelle letztlich in Apoptose geht, von der Expressionsstärke dieser Proteine ab (Scarabelli et al. 2006).

C-FLIP ist ein Inhibitor des rezeptorvermittelten Apoptoseweges. Nach Bindung eines entsprechenden Liganden an einen TNF-Rezeptor wird Procaspase 8 in die aktive Caspase 8 gespalten. Sodann bindet sie an das Adapterprotein FADD und bildet DISC (Irmeler et al., 1997). c-FLIP ist dafür verantwortlich, dass Caspase 8 gehemmt wird, damit der Apoptoseweg geblockt ist. Durch die Hemmung von Caspase 8 kann wiederum auch das BH3-only Protein Bid nicht gespalten werden und die Verbindung zum mitochondrialen Weg kommt zumindest auf diese Weise nicht zum tragen (Micheau et al., 2002). Neben dem potenten Apoptoseinhibitor c-IAP1, der auf der Ebene der Effektorcaspasen und auf der Ebene von Procaspase 9 und Caspase 9 in die Apoptosekaskade eingreift (Roy et al., 1997; Deveraux et al., 1997; Bratton et al., 2001), sichert c-FLIP den intrazellulären Sporozoiten zusätzlich gegen eine Apoptoseinduktion über den rezeptorvermittelten Weg ab (Scaffidi et al., 1998). Da die Apoptoseinduktoren Actinomycin D, Cytochalasin B und Colchicin den mitochondrialen Apoptoseweg einleiten und Cytochalasin B zusätzlich den rezeptorvermittelten Apoptoseweg aktivieren kann, ist es plausibel, dass *E. bovis*-infizierte Zellen, die vermehrt c-IAP1 und c-FLIP exprimieren, nicht in Apoptose gehen.

Eine Reihe von Untersuchungen wurden zu dem antiapoptotisch wirkenden Protein Bcl-2 aus der gleichnamigen Familie vorgenommen. Die Bcl-2-Familie spielt eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien (Zong et al., 2001). Bax ist für die Porenbildung an der äußeren Mitochondrienmembran verantwortlich und seine aktive Form kann durch Bcl-2 inhibiert werden, wobei Bad wiederum ein Gegenspieler von Bcl-2 ist (Jürgenmeister et al., 1998). Die Expression von Bcl-2 in einer infizierten Zelle könnte dazu beitragen, dass die Wirtszelle z. B. aufgrund von Stress durch die Infektion und somit durch strukturelle, biochemische Veränderungen und Form- und Größenveränderungen nicht in Apoptose gehen würde. Über eigene konfokalmikroskopische Analysen war allerdings kein Unterschied in der Expression von Bcl-2 zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen nachweisbar. Es zeigte sich lediglich eine schwache Fluoreszenzen wie sie auch in

Kontrollen auftraten. Die Verwendung eines alternativen Sekundärantikörpers änderte nichts am Ergebnis. Somit war anzunehmen, dass der verwendete murine Primärantikörper gegen Bcl-2 im Rindersystem nicht verwendbar ist.

Die Expression von Apoptoseinhibitoren in parasitierten Zellen ist grundsätzlich nicht unbekannt. Künzi et al. (2003) wiesen in *Th. parva*-infizierten T-Zellen eine verstärkte Expression von mehreren Mitgliedern der IAP-Familie und c-FLIP nach. Des Weiteren konnte er zeigen, dass auch Bcl2, BclxL und BclxS in infizierten Zellen erhöht war. Zwar zeigten infizierte Zellen eine vermehrte Expression von Fas und FasL, der programmierte Zelltod setzte jedoch nicht ein. Nach der Behandlung der Zellen mit dem theileriziden Naphtoquinonderivat Bw 720c blieb diese erhöhte Expression des Rezeptors und seines Liganden bestehen. Wegen der abnehmenden Konzentration der Apoptoseinhibitoren in der Zelle kam es schließlich zum programmierten Zelltod. Auch konnte gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B in infizierten *Th. parva*-infizierten Zellen vermehrt freigesetzt und die Expression von Genen induziert wird, die antiapoptotische Proteine enkodieren (Heussler et al., 2002; Künzi et al., 2003).

Del Cacho et al. (2004) fanden mittels Immunhistochemie in Paraffinschnitten des Caecums und des Ileums von *E. tenella* bzw. *E. necatrix* infizierten Hühnern eine vermehrte Expression von Bcl-xL im Cytoplasma infizierter Zellen. Die Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus eine verstärkte Expression von NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B nachweisen. Weiterhin konnte in *T. gondii* infizierten HL60- und U937-Zellen ein Anstieg der antiapoptotischen Moleküle Mcl-1 und Bfl-1/A1 aus der Bcl-2 - Familie nachgewiesen werden (Göbel et al., 2001; Molestina et al., 2003 Lüder et al., 2005).

Zur Absicherung gegen die Wirtszellapoptose ist für *Leishmania* bisher neben NF- $\kappa$ B die sog. Phosphoinositid 3-Kinase (PI 3-kinase) nachgewiesen worden. PI 3-kinase ist eine Lipidkinase in eukaryotischen Zellen, die u.a. eine Schlüsselfunktion für das Überleben der Zelle hat (Lisi et al., 2005; Ruhland et al., 2007).

*T. cruzi* reguliert in der befallenen Wirtszelle nachgewiesenermaßen die Apoptoseinhibitoren Bcl2 und c-FLIP hoch, um sich gegen den mitochondrialen und rezeptorvermittelten Weg zu schützen (Aoki et al., 2004; Hashimoto et al., 2005). Auch hier konnte eine Beeinflussung der PI 3-kinase und von NF- $\kappa$ B und eine Inhibition der Caspase-3-Aktivität nachgewiesen werden (Chuenkova et al., 2001; Petersen et al., 2006).

*T. gondii* verhindert das Aktivieren von Caspase-3 durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der vermehrten Expression von c-IAP1 und c-IAP2 (Molestina et al., 2003, Payne et al., 2003; Molestina et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *E. bovis* während seiner langen Entwicklungszeit zum Schizonten I die Wirtszelle sehr rasch beeinflussen kann. Bereits innerhalb von 24 h nach der Infektion ist *E. bovis* in der Lage, die Expression von Adhäsionsmolekülen, Cytokinen und proinflammatorische Chemokinen der befallenen Zelle auf transkriptioneller Ebene zu kontrollieren (Taubert et al., 2006; Hermosilla et al., 2006). Ebenso wird ein induzierter programmierter Zelltod spätestens nach 48 Stunden durch den Einzeller verhindert. Durch die vermehrte Expression von c-IAP1 greift *E. bovis* zentral in die Apoptose-Signalkaskade und zusätzlich auf der Ebene von Procaspase 9 und Caspase 9 ein. Die nachgewiesenermaßen erhöhte Konzentration von c-FLIP schützt den Parasiten zusätzlich gegen den rezeptorvermittelten Apoptoseweg, der durch eine Markierung der Wirtszelle mit Fas/FasL eingeleitet werden kann. Vor allem die verstärkte Expression von c-IAP1, aber auch die Expression von c-FLIP erklären, dass eine Inhibition der Apoptose nach der Induktion sowohl mit Actinomycin D, als auch Cytochalasin B und Colchicin in der infizierten Zelle möglich ist. Aufgrund dieser und möglicherweise anderer, bisher unbekannter Mechanismen ist es *E. bovis* möglich, trotz seiner langen Entwicklungsdauer und seiner starken intrazellulären Expansion und Umstrukturierung in der Wirtszelle zu überleben. Da bei konfokalmikroskopischen Untersuchungen c-IAP1 auch in benachbarten nicht infizierten Zellen regelmäßig erhöht war, lässt sich spekulieren, dass es sich dabei um einen parakrinen Effekt handelt, um die befallene Zelle besser vor der Apoptose zu schützen und dass diesem Phänomen eine Zell- zu- Zellkommunikation zugrunde liegt. Hinweise darauf, dass *E. bovis* die Inhibitoren selbst produziert, gibt es aufgrund vorliegender Ergebnisse nicht. In der Folge wäre es auch interessant, ob *E. bovis* noch weitere Apoptoseinhibitoren, vornehmlich aus der Bcl-2-Familie, unter Kontrolle hat.



## 6 Zusammenfassung

*Eimeria bovis*-Sporozoiten entwickelt sich *in vivo* in Endothelzellen und *in vitro* in mehreren bovinen Zelllinien in einem Zeitraum von 2-3 Wochen zum Meronten I, dem sog. Makromeronten. Dies setzt ein entsprechendes Überleben der Wirtszelle voraus. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Parasiten auf die Apoptosefähigkeit seiner Wirtszelle *in vitro* untersucht.

Für die Untersuchungen wurden Endothelzellen aus bovinen Umbilikalvenen (BUVEC), eine immortalisierten Zelllinie aus bovinen fetalen Gastrointestinalzellen (BFGC) und Vero-Zellen als Wirtszellen eingesetzt. In allen Fällen wurden geschlossene Zellrasen verwendet. Die Infektion erfolgte mit  $2,5 \times 10^4$  Sporozoiten/cm<sup>2</sup> Zellrasen. Die Befallsrate betrug gewöhnlich 30-40 %. BUVEC und BFGC erlaubten nach Infektion mit Sporozoiten die Entwicklung reifer Meronten mit einer großen Anzahl von Merozoiten innerhalb von 3 Wochen. In infizierten Vero-Zellen kam es nicht zur Weiterentwicklung der Sporozoiten, doch persistierten die Parasiten innerhalb von großen parasitophoren Vakuolen über einen Zeitraum > 3 Wochen.

Bei infizierten BUVEC-Zellrasen überlebten infizierte Zellen über einen Beobachtungszeitraum von ca. 21 Tagen bis hin zur Merozoitenfreisetzung. Ab dem 10. Tag p. i. gingen nicht infizierte Zellen in die Apoptose; letztlich war die Mehrzahl dieser Zellen betroffen. Mit zunehmender Dauer der Kultivierung wuchsen aber wieder nicht infizierte Zellen aus, sodass sich zum Teil erneut intakte Zellrasen bildeten. Auch infizierte BFGC und Vero-Zellen überlebten den Untersuchungszeitraum, doch kam es nicht zur spontanen Apoptose nicht infizierter Zellen.

In der Folge wurde geprüft, ob *E. bovis*-Infektionen Wirtszellen auch gegen experimentell gesetzte Apoptosereize schützen. Als Wirtszellen dienten hierbei BFGC und Vero-Zellen. Als Apoptoseinduktoren fanden Actinomycin D, Cytochalasin B und Colchicin Verwendung. In einleitenden Versuchen wurden für die Induktoren die Konzentrationen festgelegt, die bei den Zelllinien etwa 50 % der Zellen apoptotisch werden ließen. Vero-Zellen erwiesen sich als wesentlich resistenter als BFGC.

Anschließend lichtmikroskopische Studien und Untersuchungen mittels TUNEL-Assay zeigten, dass eine *E. bovis*-Infektion spätestens 48 h p. i. die Wirtszelle vor dem Effekt der Apoptoseinduktoren schützt. Diesbezüglich bestand zwischen den Induktoren kein Unterschied. Zu früheren Zeitpunkten p. i. ist keine Aussage möglich, da dann die Applikation der Induktoren von einem Egress der Sporozoiten gefolgt war.

Versuche, das Ausmaß der induzierbaren Apoptose anhand der Expression von Annexin V, Caspase 3 oder Cytochrom-c mittels Durchflusszytometrie und Auszählung der Zellen, bzw. Fluoroscans oder ELISA zu bestimmen, schlugen fehl. Offensichtlich waren die erreichbaren Befallsraten in einer Gesamtpopulation von Zellen aus einem Zellrasen zu gering, um entsprechende Unterschiede erfassen zu können.

Um die Mechanismen der Apoptoseinhibition durch *E. bovis* zu erfassen, wurde in konfokalmikroskopischen Studien die Expression der zelleigenen Apoptoseinhibitoren „cellular inhibitor of apoptosis protein 1“ (c-IAP1), „cellular FLICE inhibitory protein“ (c-FLIP) und „B-cell-lymphoma-2“ (Bcl-2) in infizierten und nicht infizierten BFGC in Reaktion auf Colchicin überprüft. Es zeigte sich, dass unter dem Einfluss des Induktors in infizierten Zellen c-IAP1 und c-FLIP signifikant stärker exprimiert wurden als in nicht infizierten Zellen. Somit wurde der Nachweis erbracht, dass *E. bovis*-Sporozysten sowohl den rezeptorvermittelten Weg der Apoptose (c-FLIP) beeinflussen können, als auch durch eine verstärkte Expression von c-IAP1 in der Wirtszelle die Caspase 9 und die Effektorcaspase 3 blockieren, um damit zentral in den Ablauf der Apoptose einzugreifen. Im Falle von c-IAP1 betraf die erhöhte Expression auch parasitenfreie Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft infizierter Zellen. Hierin wurde ein Hinweis auf parakrine Effekte gesehen. Der Nachweis von Bcl-2 konnte nicht erbracht werden, offensichtlich, weil der zu Verfügung stehende heterologe Antikörper nicht ausreichend kreuzreagierte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *E. bovis* die Fähigkeit seiner Wirtszelle zur Apoptose beeinträchtigt und so seine lang andauernde Entwicklung zum Meronten sichert.

## 7 Summary

*Eimeria bovis* sporozoites develop *in vivo* in endothelial cells and *in vitro* in several bovine cell types within 2-3 weeks to 1<sup>st</sup> generation meronts, so-called macromeronts. The precondition for this development is on corresponding survival of the host cell. The current study was undertaken to investigate *in vitro* whether *E. bovis* interferes with the ability of a host cell to undergo apoptosis.

Three different cell types were employed: (i) Bovine umbilical vein cells (BFGC), (ii) immortalized bovine foetal gastrointestinal cells (BFGC) and (iii) Vero-cells. In all cases closed cell layers were used. Cell layers were infected with  $2.5 \times 10^4$  sporozoites/cm<sup>2</sup>. Usually 30-40 % of the cells were infected. BUVEC and BFGC allow the complete maturation of 1<sup>st</sup> generation meronts; Vero-cells become invaded by sporozoites, however, the parasites do not develop further although they survive for > 3 weeks in large parasitophorous vacuoles.

Infected BUVEC survived the observation period of 3 weeks up to the release of merozoites. Beginning 10 days p. i., uninfected cells of the cell layer underwent apoptosis and finally most of them were concerned. With increasing time of infection, however, non infected cells proliferated anew. Infected BFGC and Vero-cells survived throughout the observation period as well, but there was no apoptosis in uninfected cells.

To investigate whether infected BFGC and Vero-cells resist artificially induced apoptosis, they were exposed to actinomycin D, cytochalasin B and colchicine as inducers of apoptosis. Initial experiments with uninfected cells revealed markedly higher resistance of Vero-cells compared to BFGC. Light microscopic investigation and TUNEL-assay studies showed, that *E. bovis* protects its host cells from effects of apoptosis inducers at the latest 48 h p. i. There was no difference between the inducer compounds. An earlier effect could not be checked because treatment of infected cell layers early after infection provoked the sporozoites to egress from the host cell.

Attempts to determine apoptosis rates in infected cell layers with the expression of Annexin V, Caspase 3 and cytochrome-c by flow cytometry, flouroskan techniques and ELISA failed. The probable reason is seen in an insufficient infection rate within a cell layer.

Confocal microscopy showed that infected, colchicine-challenged BFGC overexpress „cellular inhibitor of apoptosis protein1“ (c-IAP1) and „cellular Flice inhibitory protein“ (c-FLIP) when compared to parasite free cells. The strong expression of c-IAP1 in infected cells *E. bovis* suggests a central influence in the host cell apoptosis by blocking the effector caspase 3 and caspase 9. C-FLIP in *E. bovis*- infected cells proves that the parasite also inhibits the receptor pathway of apoptosis. In case of c-IAP1 even non infected cells in the direct neighbourhood of

infected cells showed over expression, points at paracrine effects. Attempts to demonstrate Bcl-2 failed, probably due to insufficient cross-reactivity of the heterologous antibody employed.

In conclusion, the study shows that *E bovis* interferes with the ability of its host cell to undergo apoptosis, probably to ensure its own development to 1<sup>st</sup> generation meronts.

## 8 Literaturübersicht

**J. M. Adams** and S. Cory. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281 (5381):1322-1326, 1998.

**K. D. Adjogble**, C. Mercier, J. F. Dubremetz, C. Hucke, C. R. Mackenzie, M. F. Cesbron-Delauw, and W. Daubener. GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int.J.Parasitol.* 34 (11):1255-1264, 2004.

**E. Aga**, D. M. Katschinski, G. van Zandbergen, H. Laufs, B. Hansen, K. Muller, W. Solbach, and T. Laskay. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of Immunology* 169 (2):898-905, 2002.

**B. Alberts**, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. Molecular Biology of the cell. Garland Science, 4. Auflage. 2002

**M. P. Aoki**, N. L. Guinazú, T. Gotoh, D. T. Masih and S. Gea. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Feb;286(2):C206-12. Epub 2003 Sep 17.

**E. A. Atkinson**, M. Barry, A. J. Darmon, I. Shostak, P. C. Turner, R. W. Moyer, and R. C. Bleackley. Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide - Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *Journal of Biological Chemistry* 273 (33):21261-21266, 1998.

**M. Barkett** and **T. D. Gilmore**. Control of apoptosis by Rel/NF-kappa B transcription factors. *Oncogene* 18 (49):6910-6924, 1999.

**H. M. Beere**, B. B. Wolf, K. Cain, D. D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Taylor, R. I. Morimoto, G. M. Cohen, and D. R. Green. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology* 2 (8):469-475, 2000.

**H. M. Beere**. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *Journal of Clinical Investigation* 115 (10):2633-2639, 2005.

**J. H. Behrendt**, W. Clauss, H. Zahner, and C. Hermosilla. Alternative mechanism of *Eimeria bovis* sporozoites to invade cells *in vitro* by breaching the plasma membrane. *Journal of Parasitology* 90 (5):1163-1165, 2004.

**J. H. Behrendt**, H. Milde, W.-M. Weber, S. Kowalik, H. Zahner, H.-J. Bürger and W. Clauss. Intracellular calcium and pH conditions of cultured cells infected with *Eimeria bovis* or *E. separata*. *Parasitol Res.* 2000 Apr;86(4)

**J. H. Behrendt**, A. Taubert, H. Zahner, C. Hermosilla. Studies on synchronous egress of coccidian parasites (*Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria bovis*) from bovine endothelial host cells mediated by calcium ionophore A23187

- S. B. Bratton**, G. Walker, S. M. Srinivasula, X. M. Sun, M. Butterworth, E. S. Alnemri, and G. M. Cohen. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and-3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *Embo Journal* 20 (5):998-1009, 2001.
- S. B. Bratton**, G. Walker, D. L. Roberts, K. Cain, and G. M. Cohen. Caspase-3 cleaves Apaf-1 into an similar to 30 kDa fragment that associates with an inappropriately oligomerized and biologically inactive similar to 1.4 MDa apoptosome complex. *Cell Death and Differentiation* 8 (4):425-433, 2001.
- I. Budihardjo**, H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, and X. D. Wang. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15:269-290, 1999.
- J. Bumstead** and F. Tomley. Induction of secretion and surface capping of microneme proteins in *Eimeria tenella*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 110 (2):311-321, 2000.
- H.-J. Bürger**. *Eimeria* Infektionen beim Rind. *Berlin München Tierärztliche Wochenschrift* (69): 350-357, 1983
- K. L. Carey**, C. G. Donahue, and G. E. Ward. Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 105 (1):25-37, 2000.
- J. C. Carmen**, L. Hardi, and A. P. Sinai. *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cellular Microbiology* 8 (2):301-315, 2006.
- M. Carrolo**, S. Giordano, L. Cabrita-Santos, S. Corso, A. M. Vigario, S. Silva, P. Leiriao, D. Carapau, R. Armas-Portela, P. M. Comoglio, A. Rodriguez, and M. M. Mota. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nature Medicine* 9 (11):1363-1369, 2003.
- M. F. Cesbron-Delauw**, B. Guy, G. Torpier, R. J. Pierce, G. Lenzen, J. Y. Cesbron, H. Charif, P. Lepage, F. Darcy, J. P. Lecocq, and . Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 86 (19):7537-7541, 1989.
- J. Y. Channon**, K. A. Miselis, L. A. Minns, C. Dutta, and L. H. Kasper. *Toxoplasma gondii* induces granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion by human fibroblasts: Implications for neutrophil apoptosis. *Infection and Immunity* 70 (11):6048-6057, 2002.
- X. M. Chen**, S. A. Levine, S. L. Splinter, G. J. Gores, C. V. Paya, and N. F. LaRusso. Activation of nuclear factor KB in human cholangiocytes by *cryptosporidium parvum* induces secretion of interleukin-8 from and prevents apoptosis in directly infected cells. *Hepatology* 32 (4):295A, 2000.
- X. M. Chen**, B. Q. Huang, P. L. Splinter, M. A. McNiven, and N. F. LaRusso. Molecular mechanism of *Cryptosporidium parvum* invasion of biliary epithelia. *Gastroenterology* 120 (5):A325, 2001.

- X. M. Chen**, S. A. Levine, P. L. Splinter, P. S. Tietz, A. L. Ganong, C. Jobin, G. J. Gores, C. V. Paya, and N. F. LaRusso. Cryptosporidium parvum activates nuclear factor kappa B in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology* 120 (7):1774-1783, 2001.
- J. E. Chipuk** and D. R. Green. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (3):268-275, 2005.
- J. E. Chipuk**, L. Bouchier-Hayes, T. Kuwana, D. D. Newmeyer, and D. R. Green. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 309 (5741):1732-1735, 2005.
- M. V. Chuenkova** and M. A. Pereira. A trypanosomal protein synergizes with the cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent apoptosis of neuronal cells. *Molecular Biology of the Cell* 11 (4):1487-1498, 2000.
- R. K. Clark** and R. E. Kuhn. Trypanosoma cruzi does not induce apoptosis in murine fibroblasts. *Parasitology* 118:167-175, 1999.
- R. J. Clem**, J. M. Hardwick and L. K. Miller. Anti-apoptotic genes of baculoviruses. *Cell Death Differ.* 1996 Jan. 3(1):9-16.
- J.J. Cohen** , R.C. Duke, R.C. Fadok, K. S. Sellin. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:267-93. Review.
- A. Columbano**. Cell-Death - Current Difficulties in Discriminating Apoptosis from Necrosis in the Context of Pathological Processes In-Vivo. *Journal of Cellular Biochemistry* 58 (2):181-190, 1995.
- S. C. Cosulich**, P. J. Savory, and P. R. Clarke. Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c. *Current Biology* 9 (3):147-150, 1999.
- D. D'Amours**, M. Germain, K. Orth, V. M. Dixit, and G. G. Poirier. Proteolysis of poly(ADP-ribose) polymerase by caspase 3: Kinetics of cleavage of mono(ADP-ribosyl)ated and DNA-bound substrates. *Radiation Research* 150 (1):3-10, 1998.
- E. Del Cacho**, M. Gallego, F. Lopez-Bernad, J. Quilez, and C. Sanchez-Acedo. Expression of anti-apoptotic factors in cells parasitized by second-generation schizonts of Eimeria tenella and Eimeria necatrix. *Vet.Parasitol.* 125 (3-4):287-300, 2004.
- Q. L. Deveraux**, R. Takahashi, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388 (6639):300-304, 1997.
- Q. L. Deveraux**, N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsedale, Q. Zhou, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17 (8):2215-2223, 1998.
- D. L. Doolan** and S. L. Hoffman. The complexity of protective immunity against liver-stage malaria. *Journal of Immunology* 165 (3):1453-1462, 2000.

- C. S. Duckett**, V. E. Nava, R. W. Gedrich, R. J. Clem, J. L. VanDongen, M. C. Gilfillan, H. Shiels, J. M. Hardwick, and C. B. Thompson. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *Embo Journal* 15 (11):2685-2694, 1996.
- B. W. Durkacz**, O. Omidiji, D. A. Gray, and S. Shall. (ADP-ribose)<sub>n</sub> participates in DNA excision repair. *Nature* 283 (5747):593-596, 1980.
- W. C. Earnshaw**, L. M. Martins, and S. H. Kaufmann. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 68:383-424, 1999.
- J. Eckert**, K. T. Friedhoff, H. Zahner, P. Deplazes. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag, 2004
- K. Ebnet** and D. Vestweber. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem. Cell Biol.* 112 (1):1-23, 1999.
- J.V. Ernst** and G.W. Bentz: Intestinal coccidiosis in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* (2): 283-291, 1986
- H. G. Fischer**, S. Stachelhaus, M. Sahm, H. E. Meyer, and G. Reichmann. GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91 (2):251-262, 1998.
- S. Goebel**, U. Gross, and C. G. K. Luder. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *Journal of Cell Science* 114 (19):3495-3505, 2001.
- A. Golks**, D. Brenner, I. Schmitz, C. Watzl, A. Krueger, P. H. Krammer, and I. N. Lavrik. The role of CAP3 in CD95 signaling: new insights into the mechanism of procaspase-8 activation. *Cell Death and Differentiation* 13 (3):489-498, 2006.
- A. Golks**, D. Brenner, P. H. Krammer, and I. N. Lavrik. The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappa B activation. *Journal of Experimental Medicine* 203 (5):1295-1305, 2006.
- Y. V. Goltsev**, A. V. Kovalenko, E. Arnold, E. E. Varfolomeev, V. M. Brodianskii, and D. Wallach. CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *Journal of Biological Chemistry* 272 (32):19641-19644, 1997.
- R. A. Gottlieb**. Mitochondria and apoptosis. *Biological Signals and Receptors* 10 (3-4):147-161, 2001.
- D. R. Green** and J. C. Reed. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281 (5381):1309-1312, 1998.
- G. Gräfner**, H.-D. Graubmann, K. Schwarz, T.H. Hiepe, A. Kron. Weitere Untersuchungen zum Vorkommen, Epizootologie und Bekämpfung der *Eimeria*-Kokzidiose des Rindes unter Bedingungen der intensiven Stallhaltung. *Mh. Vet. Med.* (40): 41-44, 1985



- A. B. Gustafsson** and R. A. Gottlieb. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J.Clin.Immunol.* 23 (6):447-459, 2003.
- G. Hacker.** The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research* 301 (1):5-17, 2000.
- B. S. Hall,** W. Tam, R. Sen, and M. E. A. Pereira. Cell-specific activation of nuclear factor-kappa B by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. *Molecular Biology of the Cell* 11 (1):153-160, 2000.
- D. H. Hamer,** H. Ward, S. Tzipori, M. E. A. Pereira, J. P. Alroy, and G. T. Keusch. Attachment of *Cryptosporidium-Parvum* Sporozoites to Mdck Cells In-Vitro. *Infection and Immunity* 62 (6):2208-2213, 1994.
- D. M. Hammond,** G. W. Bowman, L. R. Davis and T. B. Simms. The endogenous phase of the life cycle of *Eimeria bovis* . *Journal of Parasitology* (32): 409-427, 1964
- D. M. Hammond,** F. L. Andersen and M. L. Miner. The occurrence of a second asexual generation in the life cycle of *Eimeria bovis* in calves. *Journal of Parasitology* (49): 428-434, 1963
- D. K. M. Han,** P. M. Chaudhary, M. E. Wright, C. Friedman, B. J. Trask, R. T. Riedel, D. G. Baskin, S. M. Schwartz, and L. Hood. MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclX(L) and initiates cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (21):11333-11338, 1997.
- M. Hashimoto,** J. Nakajima-Shimada and T. Aoki. *Trypanosoma cruzi* posttranscriptionally up-regulates and exploits cellular FLIP for inhibition of death-inducing signal. *Mol Biol Cell.* 2005 Aug;16(8):3521-8. Epub 2005 May 25.
- C. Hermosilla,** B. Barbisch, A. Heise, S. Kowalik, and H. Zahner. Development of *Eimeria bovis* *in vitro*: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. *Parasitology Research* 88 (4):301-307, 2002.
- C. Hermosilla,** H. Zahner, and A. Taubert. *Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells. *International Journal for Parasitology* 36 (4):423-431, 2006.
- V. T. Heussler,** P. Kuenzi, and S. Rottenberg. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International Journal for Parasitology* 31 (11):1166-1176, 2001.
- H. Hisaeda** and K. Himeno. The role of host-derived heat-shock protein in immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Parasitology Today* 13 (12):465-468, 1997.
- B. Hobson** and J. Denekamp. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br.J.Cancer* 49 (4):405-413, 1984.
- K. Hofmann.** The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55 (8-9):1113-1128, 1999.

- M. S. Hu**, J. D. Schwartzman, G. R. Yeaman, J. Collins, R. Seguin, I. A. Khan, and L. H. Kasper. Fas-FasL interaction involved in pathogenesis of ocular toxoplasmosis in mice. *Infection and Immunity* 67 (2):928-935, 1999.
- H. Huang**, T. M. Calderon, J. W. Berman, V. L. Braunstein, L. M. Weiss, M. Wittner, and H. B. Tanowitz. Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF-kappa B and induces vascular adhesion molecule expression. *Infection and Immunity* 67 (10):5434-5440, 1999.
- C. G. Huh**, V. M. Factor, A. Sanchez, K. Uchida, E. A. Conner, and S. S. Thorgeirsson. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (13):4477-4482, 2004.
- N. Inohara**, T. Koseki, Y. Hu, S. Chen, and G. Nunez. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (20):10717-10722, 1997.
- M. Irmeler**, M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, B. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French, and J. Tschopp. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388 (6638):190-195, 1997.
- M. K. Jacobson** and E. L. Jacobson. Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more. *Trends Biochem.Sci.* 24 (11):415-417, 1999.
- D. E. Johnson**. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia* 14 (8):1340-1344, 2000.
- J. M. Jurgensmeier**, Z. H. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen, and J. C. Reed. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (9):4997-5002, 1998.
- I. Kalousek**, B. Brodska, P. Otevrelova and T. Röselova. Actinomycin D upregulates proapoptotic protein Puma and downregulates Bcl-2 mRNA in normal peripheral blood lymphocytes. *Anticancer Drugs*. 2007 Aug;18(7):763-72
- D. Kanduc**, A. Mittelman, R. Serpico, E. Sinigaglia, A. A. Sinha, C. Natale, R. Santacroce, M. G. Di Corcia, A. Lucchese, L. Dini, P. Pani, S. Santacroce, S. Simone, R. Bucci, and E. Farber. Cell death: Apoptosis versus necrosis (review). *International Journal of Oncology* 21 (1):165-170, 2002.
- M. Karin** and Y. Ben Neria. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-kappa B activity. *Annual Review of Immunology* 18:621-+, 2000.
- F. H. Kayser**, K. A. Bienz, J. Eckert and R. M. Zinkernagel. Medizinische Mikrobiologie. Thieme Verlag 9. Auflage, 1998
- P. Keller**, F. Schaumburg, S. F. Fischer, G. Hacker, U. Gross, and C. G. K. Luder. Direct inhibition of cytochrome c-induced caspase activation *in vitro* by *Toxoplasma gondii* reveals novel mechanisms of interference with host cell apoptosis. *Fems Microbiology Letters* 258 (2):312-319, 2006.

- O. J. F. Kerr.** History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182:471-474, 2002.
- P. Kuenzi,** P. Schneider, and D. A. E. Dobbelaere. Theileria parva-transformed T cells show enhanced resistance to Fas/Fas ligand-induced apoptosis. *Journal of Immunology* 171 (3):1224-1231, 2003.
- F. Laurent,** L. Eckmann, T. C. Savidge, G. Morgan, C. Theodos, M. Naciri, and M. F. Kagnoff. Cryptosporidium parvum infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infection and Immunity* 65 (12):5067-5073, 1997.
- I. Lavon,** I. Goldberg, S. Amit, L. Landsman, S. Jung, B. Z. Tsuberi, I. Barshack, J. Kopolovic, E. Galun, H. Bujard, and Y. Ben Neriah. High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappa B activation. *Nature Medicine* 6 (5):573-577, 2000.
- L. Lecordier,** C. Mercier, G. Torpier, B. Tourvieille, F. Darcy, J. L. Liu, P. Maes, A. Tartar, A. Capron, and M. F. Cesbron-Delauw. Molecular structure of a Toxoplasma gondii dense granule antigen (GRA 5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Mol.Biochem.Parasitol.* 59 (1):143-153, 1993.
- P. Leiriao,** M. M. Mota, and A. Rodriguez. Apoptotic Plasmodium-infected hepatocytes provide antigens to liver dendritic cells. *Journal of Infectious Diseases* 191 (10):1576-1581, 2005.
- P. Leiriao,** S. S. Albuquerque, S. Corso, G. J. van Gemert, R. W. Sauerwein, A. Rodriguez, S. Giordano, and M. M. Mota. HGF/MET signalling protects Plasmodium-infected host cells from apoptosis. *Cellular Microbiology* 7 (4):603-609, 2005.
- M. A. Leriche** and J. F. Dubremetz. Exocytosis of Toxoplasma gondii dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol.Res.* 76 (7):559-562, 1990.
- P. Li, D. Nijhawan,** I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. D. Wang. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 (4):479-489, 1997.
- O. Liesenfeld,** J. C. Kosek, and Y. Suzuki. Gamma interferon induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's patch T cells in mice following peroral infection with Toxoplasma gondii. *Infection and Immunity* 65 (11):4682-4689, 1997.
- S. Lisi,** M. Sisto, A. Acquafredda, R. Spinelli, M. A. Schiavone, V. Mitolo, O. Brandonisio, and M. A. Panaro. Infection with Leishmania infantum inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (3):211-217, 2005.
- P. Liston,** N. Roy, K. Tamai, C. Lefebvre, S. Baird, G. ChertonHorvat, R. Farahani, M. McLean, J. E. Ikeda, A. MacKenzie, and R. G. Korneluk. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379 (6563):349-353, 1996.

- M. Locati**, E. Riboldi, K. Otero, F. O. Martinez, F. Riva, P. Perrier, S. Baviera, P. Signorelli, R. Bonecchi, P. Allavena, S. Sozzani, and A. Mantovani. Regulation of the chemokine system at the level of chemokine receptor expression and signaling activity. *Immunobiology* 204 (5):536-542, 2001.
- C. G. K. Lüder**, U. Gross, and M. F. Lopes. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends in Parasitology* 17 (10):480-486, 2001.
- C. G. K. Lüder** and U. Gross. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: Molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Role of Apoptosis in Infection* 289:219-237, 2005.
- X. Luo**, I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. D. Wang. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94 (4):481-490, 1998.
- S. K. Manna**, M. T. Kuo, and B. B. Aggarwal. Overexpression of gamma-glutamylcysteine synthetase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappa B and activator protein-1. *Oncogene* 18 (30):4371-4382, 1999.
- M. A. Marcial** and J. L. Madara. Cryptosporidium: cellular localization, structural analysis of absorptive cell-parasite membrane-membrane interactions in guinea pigs, and suggestion of protozoan transport by M cells. *Gastroenterology* 90 (3):583-594, 1986.
- O. G. Majno** and I. Joris. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am.J.Pathol.* 146 (1):3-15, 1995.
- D. F. McCole**, L. Eckmann, F. Laurent, and M. F. Kagnoff. Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity* 68 (3):1710-1713, 2000.
- O. Micheau**, M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D. W. Nicholson, C. Briand, and M. G. Grutter. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the fas death-inducing signaling complex. *Journal of Biological Chemistry* 277 (47):45162-45171, 2002.
- R. E. Molestina** and A. P. Sinai. Detection of a novel parasite kinase activity at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host I kappa B alpha. *Cellular Microbiology* 7 (3):351-362, 2005.
- R. E. Molestina**, T. M. Payne, I. Coppens and A. P. Sinai. Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Sci.* 2003 Nov 1;116(Pt 21):4359-71. Epub 2003 Sep 9
- K. J. Moore** and G. Matlashewski. Intracellular Infection by *Leishmania-Donovani* Inhibits Macrophage Apoptosis. *Journal of Immunology* 152 (6):2930-2937, 1994.
- K. J. Moore**, S. J. Turco, and G. Matlashewski. *Leishmania-Donovani* Infection Enhances Macrophage Viability in the Absence of Exogenous Growth-Factor. *Journal of Leukocyte Biology* 55 (1):91-98, 1994.

- D. G. Mordue**, S. Hakansson, I. Niesman, and L. D. Sibley. Toxoplasma gondii resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp.Parasitol.* 92 (2):87-99, 1999.
- M. T. Morris**, A. Coppin, S. Tomavo, and V. B. Carruthers. Functional analysis of Toxoplasma gondii protease inhibitor 1. *J.Biol.Chem.* 277 (47):45259-45266, 2002.
- D. D. Mosser**, A. W. Caron, L. Bourget, A. B. Meriin, M. Y. Sherman, R. I. Morimoto, and B. Massie. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 20 (19):7146-7159, 2000.
- P. B. Nash**, M. B. Purner, R. P. Leon, P. Clarke, R. C. Duke, and T. J. Curiel. Toxoplasma gondii-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *Journal of Immunology* 160 (4):1824-1830, 1998.
- D. A. Norris**, M. H. Middleton, K. Whang, M. Schleicher, T. McGovern, S. D. Bennion, K. DavidBajar, D. Davis, and R. C. Duke. Human keratinocytes maintain reversible anti-apoptotic defenses *in vivo* and *in vitro*. *Apoptosis* 2 (2):136-148, 1997.
- P.A. Nyberg** and D.M. Hammond. Excystation of *E. bovis* and other species of bovine coccidian. *Journal of Protozoology* (11): 474-480, 1964
- S. P. O'Hara** and J. J. C. Lin. Accumulation of tropomyosin isoform 5 at the infection sites of host cells during Cryptosporidium invasion. *Parasitology Research* 99 (1):45-54, 2006.
- G. H. Palmer**, J. Machado, P. Fernandez, V. Heussler, T. Perinat, and D. A. E. Dobbelaere. Parasite-mediated nuclear factor kappa B regulation in lymphoproliferation caused by Theileria parva infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (23):12527-12532, 1997.
- P. Pandey**, A. Saleh, A. Nakazawa, S. Kumar, S. M. Srinivasula, V. Kumar, R. Weichselbaum, C. Nalin, E. S. Alnemri, D. Kufe, and S. Kharbanda. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *Embo Journal* 19 (16):4310-4322, 2000.
- T. M. Payne**, R. E. Molestina and A. P. Sinai. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the Toxoplasma gondii-mediated blockade of host apoptosis. *J Cell Sci.* 2003 Nov 1;116(Pt 21):4345-58. Epub 2003 Sep 9
- C. A. Petersen**, K. A. Krumholz, J. Carmen, A. P. Sinai, and B. A. Burleigh. Trypanosoma cruzi infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. *Infection and Immunity* 74 (3):1580-1587, 2006.
- B. Poppelmann**, K. Klimmek, E. Strozyk, R. Voss, T. Schwarz, and D. Kulms. NF kappa B-dependent down-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated proteins contributes to interleukin-1-mediated enhancement of ultraviolet B-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 280 (16):15635-15643, 2005.
- C. Purring-Koch** and G. McLendon. Cytochrome c binding to Apaf-1: The effects of dATP and ionic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (22):11928-11931, 2000.

- D. M. Rasper**, J. P. Vaillancourt, S. Hadano, V. M. Houtzager, I. Seiden, S. L. C. Keen, P. Tawa, S. Xanthoudakis, J. Nasir, D. Martindale, B. F. Koop, E. P. Peterson, N. A. Thornberry, J. Q. Huang, D. P. MacPherson, S. C. Black, F. Hornung, M. J. Lenardo, M. R. Hayden, S. Roy, and D. W. Nicholson. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death and Differentiation* 5 (4):271-288, 1998.
- A. Ruhland**, N. Leal and P. E. Kima. Leishmania promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cell Microbiol.* 2007 Jan;9(1):84-96. Epub 2006 Aug 2.
- N. Roy**, Q. L. Deveraux, R. Takahashi, O. Zhou, G. Ambrosini, D. Altieri, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Blood* 90 (10):2645, 1997.
- R. Sahlinger**. Beitrag zur Verbreitung der Rinderkokzidien in Österreich sowie Versuche zur Differenzialdiagnose von Oozysten mittels Rasterelektronenmikroskopie und Disk-Elektrophorese: *Inaug. Diss., Vet. Med. Wien*, 1977
- K. Saji**, Y. Fukumoto, J. Suzuki, S. Fukui, J. Nawata and H. Shimokawa. Colchicine, a microtubule depolymerizing agent, inhibits myocardial apoptosis in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2007 Oct;213(2):139-48.
- A. Saleh**, S. M. Srinivasula, L. Balkir, P. D. Robbins, and E. S. Alnemri. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biology* 2 (8):476-483, 2000.
- M. Santin**, J. M. Trout, L. H. Xiao, L. Zhou, E. Greiner, and R. Fayer. Prevalence and age-related variation of Cryptosporidium species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology* 122 (2):103-117, 2004.
- A. Saraste**. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* 24 (3):189-195, 1999.
- A. Saraste** and K. Pulkki. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* 45 (3):528-537, 2000.
- C. Scaffidi**, S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer, and M. E. Peter. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo Journal* 17 (6):1675-1687, 1998.
- M. Scanlon**, G. J. Leitch, A. P. Shaw, H. Moura, and G. S. Visvesvara. Susceptibility to apoptosis is reduced in the microsporidia-infected host cell. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46 (5):34S-35S, 1999.
- T. M. Scarabelli**, R. Knight, A. Stephanou, P. Townsend, C. Chen-Scarabelli, K. Lawrence, R. Gottlieb, D. Latchman, and J. Narula. Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium. *Current Problems in Cardiology* 31 (3):181-264, 2006.
- M. K. Shaw**. Theileria parva sporozoite entry into bovine lymphocytes involves both parasite and host cell signal transduction processes. *Experimental Parasitology* 84 (3):344-354, 1996.
- Y. G. Shi**. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* 9 (3):459-470, 2002.

- H. B. Shu**, D. R. Halpin, and D. V. Goeddel. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 6 (6):751-763, 1997.
- L. D. Sibley**, I. R. Niesman, T. Asai, and T. Takeuchi. Toxoplasma gondii: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. *Exp.Parasitol.* 79 (3):301-311, 1994.
- Z. Siegfried**, P. J. Shteper, F. A. Asimakopoulos, G. A. Palumbo, E. A. Rachmilewitz, Y. Ben Neriah, and D. Ben Yehuda. Methylation of ABL1 in acute lymphatic leukemia (ALL). *Blood* 94 (10):595A, 1999.
- S. M. Srinivasula**, M. Ahmad, S. Otilie, F. Bullrich, S. Banks, Y. Wang, T. Fernandes-Alnemri, C. M. Croce, G. Litwack, K. J. Tomaselli, R. C. Armstrong, and E. S. Alnemri. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272 (30):18542-18545, 1997.
- H. R. Stennicke**, J. M. Jurgensmeier, H. Shin, Q. Deveraux, B. B. Wolf, X. Yang, Q. Zhou, H. M. Ellerby, L. M. Ellerby, D. Bredesen, D. R. Green, J. C. Reed, C. J. Froelich, and G. S. Salvesen. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J.Biol.Chem.* 273 (42):27084-27090, 1998.
- R. Takahashi**, Q. Deveraux, I. Tamm, K. Welsh, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *Journal of Biological Chemistry* 273 (14):7787-7790, 1998.
- A. Taubert**, M. Krull, H. Zahner, and C. Hermosilla. Toxoplasma gondii and Neospora caninum infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112 (3-4):272-283, 2006.
- A. Taubert**, C. Hermosilla, J. Behrendt, and H. Zahner. Responses of bovine endothelial cells *in vitro* to coccidia (Eimeria bovis, Toxoplasma gondii, Neospora caninum) infections possibly involved in innate immunity. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 119 (7-8):274-281, 2006.
- T. F. Tedder, D. A. Steeber, A. Chen, and P. Engel. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 9 (10):866-873, 1995.
- F. M. Tomley** and D. S. Soldati. Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends Parasitol.* 17 (2):81-88, 2001.
- C. van de Sand**, S. Horstmann, A. Schmidt, A. Sturm, S. Bolte, A. Krueger, M. Lutgehetmann, J. M. Pollok, C. Libert, and V. T. Heussler. The liver stage of Plasmodium berghei inhibits host cell apoptosis. *Molecular Microbiology* 58 (3):731-742, 2005.
- Y. Uchiyama**. Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsin. *Arch Histol Cytol.* 64(3):233-46. Review. 2001
- M. G. Vander Heiden** and C. B. Thompson. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology* 1 (8):E209-E216, 1999.

**M. G. Van der Heiden**, N. S. Chandel, P. T. Schumacker, and C. B. Thompson. Bcl-x(L) prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Molecular Cell* 3 (2):159-167, 1999.

**G. van Zanderbergen**, M. Klinger, A. Müller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach and T. Laskay. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages.

J Immunol. 2004 Dec 1;173(11):6521-5.

G. van Zanderbergen, W. Solbach and T. Laskai Apoptosis driven infection. Autoimmunity. 2007 Jun;40(4):349-52. Review.

**K. H. Vousden** and G. F. Vande Woude. The ins and outs of p53. *Nature Cell Biology* 2 (10):E178-E180, 2000.

**K. H. Vousden**. p53: Death star. *Cell* 103 (5):691-694, 2000.

**M. J. Wang**, S. Liu and D. Zheng. Actinomycin D enhances TRAIL-induced caspase-dependent and -independent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci Res.* 2007 Sep;59(1):40-6

**W.J, Whish** and G. Poirer. Adenosine diphosphate ribosylation of proteins in rat pancreas [proceedings]. *Biochem Soc Trans.* 1980 Apr;8(2):192.

**C. B. Wilson**, J. S. Remington, S. Stagno, and D. W. Reynolds. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital Toxoplasma infection. *Pediatrics* 66 (5):767-774, 1980.

**W. X. Zong**, T. Lindsten, A. J. Ross, G. R. MacGregor, and C. B. Thompson. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & Development* 15 (12):1481-1486, 2001.

**O. J. Zhang** and S. Rivest. Anti-inflammatory effects of prostaglandin E2 in the central nervous system in response to brain injury and circulating lipopolysaccharide. *J.Neurochem.* 76 (3):855-864, 2001.



## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Jahre meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Herrn Professor Dr. Horst Zahner danke ich für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, die langjährige und wissenschaftliche Begleitung und Korrektur meiner Arbeit.

Bei Herrn Dr. Carlos Hermosilla und Frau Dr. Anja Taubert bedanke ich mich herzlichst für ihre vielen Ideen und die unablässige Unterstützung (auch auf privater Ebene – ich werde es euch nie vergessen!).

Größter Dank geht an Herrn Professor Dr. Michael Kann, der mir die Nutzung des Konfokalmikroskops ermöglicht hat, dessen Hilfe meine wissenschaftliche Arbeit immens vorangetrieben hat und der mir mit seiner Persönlichkeit stets den Tag erhellt hat.

Ich danke Herrn Dr. Christian Bauer, der dafür gesorgt hat, dass ich während meiner Zeit am Institut für Parasitologie keine allzu großen finanziellen Engpässe erleiden musste und der mich stets mit praxisrelevanten Artikeln und Süßigkeiten aus fernen Ländern versorgt hat.

Sehr großer Dank geht an Frau Brigitte Hofmann, Frau Birgit Reinhard, Frau Christine Hennrich und Frau Christina Scheld, die mir immer sehr hilfsbereit zur Seite gestanden haben und für eine nette Atmosphäre gesorgt haben, in der ich mich sehr wohl gefühlt habe. Nicht zu vergessen ist, dass alle übrigen Mitarbeiter des Instituts für Parasitologie (und damit meine ich wirklich ALLE) dazu beigetragen haben, dass ich dort gerne meine Arbeit verrichtet habe, auch wenn es manchmal nicht ganz einfach für mich war.

Bei Svenja Beckmann, Kathleen Lutz, Denis Wolf, Dr. Jan Behrendt, Dr. Thomas Quack und Dr. Viktor Dyachenko, auf deren Hilfe ich mich immer verlassen konnte, bedanke ich mich, weil sie im und außerhalb des Institut für Parasitologie einen großen Anteil daran hatten, dass ich in den vergangenen Jahren einiges zu Lachen hatte. Svenja und Thomas danke ich insbesondere für die mit mir durchwachte Formatierungsnacht!

Aus anderen Instituten erhielt ich kompetente Unterstützung von Marion Holl, Alexandra Schwarz, Melanie Mohr, Etienne und Ivonne Stamm. Vielen Dank dafür!

Durch alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre sind außerdem mit mir gegangen:

Kai Lang, Sabine Ringer, Karin Rattinger, Stefanie Deike, Yvonne und Christina Schichowski, Beate Kötter-Wenz, Christof Wenz, Sibylle und Sabine Bau, Angelika Engelfried und Willi Nadler.

Vielen Dank für eure vielfältige Unterstützung (insbesondere für das exzellente Korrektur-Lesen der Arbeit von Karin und Steffi) und dafür, dass ihr für mich da wart!

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte, fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter, wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5271-4

